

Molekulare RNA*interference*-Analysen zur Funktion des  
*insulin-like growth factor* (IGF)-II Signalweges in der  
humanen Hepatokarzinogenese

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

zur

Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Universität zu Köln

vorgelegt von

Tanja Nußbaum

aus Mettmann

Köln, 2006

Berichtersteller:

Tag der mündlichen Prüfung

Prof. Dr Klein  
Prof. Dr. Abken  
10. Juli 2006



1.	Einleitung .....	1
1.1.	Die Leber .....	1
1.1.1.	Aufbau und Funktion der Leber .....	1
1.2.	Das hepatozelluläre Karzinom .....	1
1.2.1.	Epidemiologie .....	2
1.2.2.	Molekulare Mechanismen der Hepatokarzinogenese .....	4
1.2.2.1.	Mutationen tumorrelevanter Gene .....	4
1.2.2.2.	Dysregulation tumorassoziierter Signalwege .....	7
1.3.	IGF-Achse .....	9
1.4.	IGF-Achse in der humanen Karzinogenese .....	13
1.5.	RNAinterference .....	15
1.6.	Zielsetzung .....	18
2.	Material und Methoden .....	19
2.1.	Material .....	19
2.1.1.	Verwendete Lösungen, Chemikalien und Kits .....	19
2.1.2.	Geräte .....	20
2.1.3.	Western Blot Antikörper .....	20
2.1.4.	Oligonukleotide .....	21
2.1.4.1.	Primer .....	21
2.1.4.2.	TaqMan Sonden .....	22
2.1.4.3.	siRNA Sequenzen .....	22
2.1.5.	Zellkulturmedien, Lösungen und Zellkulturzusätze .....	23
2.1.6.	Zelllinien .....	24
2.2.	Methoden .....	24
2.2.1.	Zellkultur .....	24
2.2.1.1.	Passagieren der Zellen .....	24
2.2.1.2.	Kryokonservierung und Auftauen der Zellen .....	25
2.2.1.3.	Zellzahlbestimmung .....	25
2.2.1.4.	Kontaminationsprüfung .....	25
2.2.1.5.	siRNA Transfektion .....	25
2.2.1.6.	Behandlung der Zellen mit Chemotherapeutika .....	26
2.2.2.	Nukleinsäuretechniken .....	27
2.2.2.1.	siRNA Annealing .....	27
2.2.2.2.	Isolierung der Gesamt-RNA aus Zellen .....	27
2.2.2.3.	Konzentrationsbestimmung der RNA .....	27
2.2.2.4.	Reverse Transkription (cDNA Synthese) .....	28
2.2.2.5.	Semiquantitative ‚realtime‘ PCR .....	28
2.2.2.6.	Polymerasekettenreaktion (PCR) .....	30
2.2.3.	Protein-Analytik .....	31
2.2.3.1.	Isolierung zellulärer Gesamtproteinextrakte .....	31
2.2.3.2.	Bestimmung der Proteinkonzentration .....	32
2.2.3.3.	Western Immunoblot .....	32
2.2.3.4.	Densitometrische Auswertung der Proteinbanden .....	33
2.2.4.	Funktionelle Analysen .....	34
2.2.4.1.	Zellvitalitätstest (MTT-Test) .....	34
2.2.4.2.	Proliferationstest (BrdU-ELISA) .....	34
2.2.4.3.	FACS-Analyse .....	34
2.2.5.	GeneChip® Expression Arrays .....	35
2.2.5.1.	Generierung der Array-Daten .....	36
2.2.5.2.	Bioinformatische Auswertung .....	36
3.	Ergebnisse .....	39
3.1.	Optimierung des siRNA Transfektionsprozesses .....	39
3.1.1.	Protokollauswahl .....	39
3.1.2.	Optimierung der Transfektionseffizienz hinsichtlich der Zelldichte .....	40
3.1.3.	Optimierung der Transfektionsdauer und Einfluss der Zugabe von Antibiotika bezüglich der IGF-II mRNA Reduktion nach siRNA Transfektion .....	41
3.1.4.	Optimierung der siRNA Konzentration und Analyse der Wirkung einzelsträngiger RNA auf die IGF-II mRNA Konzentration .....	42
3.1.5.	Optimierung der Transfektionseffizienz in Abhängigkeit von der FCS- Konzentration .....	43
3.1.6.	Optimierung der Transfektionseffizienz hinsichtlich der Kulturdauer nach siRNA Transfektion .....	44
3.2.	IGF1R- und INSR-Reduktion mittels genspezifischer RNAi .....	45



3.2.1.	IGF1R- und INSR-mRNA Reduktion durch genspezifische siRNA Transfektion .....	46
3.2.2.	Reduktion des INSR und des IGF1R auf Proteinebene.....	47
3.2.3.	Überprüfung einer unspezifischen Interferonantwort nach siRNA Transfektion .....	49
3.2.4.	Auswirkungen der Rezeptorreduktion auf HCC-Zellvitalität.....	49
3.2.5.	Beeinflussung der Tumorzell-Apoptose nach Reduktion der Rezeptorexpression .....	50
3.2.6.	Effekte der reduzierten Rezeptorexpression auf den Phosphorylierungsstatus von Signalmolekülen.....	51
3.3.	IGF-II Reduktion mittels genspezifischer RNAi.....	52
3.3.1.	IGF-II mRNA Reduktion durch genspezifische siRNA Transfektion.....	52
3.3.2.	Überprüfung einer unspezifischen Interferonantwort nach siRNA Transfektion .....	53
3.3.3.	Auswirkungen der IGF-II-Reduktion auf die HCC Zellvitalität .....	54
3.3.4.	Einfluss der IGF-II Reduktion auf die Proliferation.....	55
3.3.5.	Beeinflussung der Tumorzell-Apoptose nach Reduktion der IGF-II-Expression .....	55
3.3.6.	Effekte der IGF-II-Reduktion auf den Phosphorylierungsstatus von       Signalmolekülen ...	56
3.4.	Vergleichende Analysen – Ligand gegen Rezeptorreduktion .....	57
3.4.1.	Einfluss der Rezeptor und der Ligandenreduktion auf die Proliferation .....	57
3.4.2.	Beeinflussung der Tumorzell-Apoptose.....	58
3.4.3.	Effekte der Rezeptor und der Ligandenreduktion auf den Phosphorylierungsstatus von Signalmolekülen.....	59
3.5.	Array-Analysen.....	62
3.5.1.	Generierung der Rohdaten .....	62
3.5.2.	Ermittlung signifikant und biologisch relevant regulierter Gene .....	62
3.5.3.	Validierung der Array-Expressionsdaten mittels ‚realtime‘ PCR .....	65
3.5.4.	Schnittmengenanalyse der Gene, die exklusiv oder gemeinsam nach genspezifischer RNAi modifiziert werden .....	65
3.5.4.1.	Identifikation durch siRNA-Transfektion modifizierter zellulärer Prozesse .....	68
3.5.4.2.	Identifikation und Validierung durch siRNA-Transfektion spezifisch regulierter Gene .....	71
3.6.	Kombinationsbehandlung der Tumorzellen: IGF-II-Reduktion mit Celecoxib oder Cisplatinapplikation .....	73
3.6.1.	Konzentrationskinetik der Wirkstoffe .....	73
3.6.2.	Kombination der IGF-II-Reduktion mit der Wirkstoffapplikation.....	74
3.6.3.	Auswirkung von Celecoxib auf die IGF1R- und INSR-Expression.....	75
4.	Diskussion .....	76
4.1.	Methodische Aspekte der mRNA-Inhibierung.....	76
4.2.	Auswirkungen der Inhibierungen auf Vitalität, Proliferation und Apoptose .....	78
4.3.	Auswirkungen der Inhibierungen auf intrazelluläre Signaltransduktionsmoleküle .....	80
4.3.1.	INSR und IGF1R, beide Rezeptoren vermitteln IGF-II induzierte Effekte.....	80
4.3.2.	Auswirkungen der IGF-Achsen-Inhibierung auf die Adhäsion.....	82
4.4.	Auswirkung der Inhibierungen auf die Genexpression.....	83
4.4.1.	Modifikation zellulärer Funktionsgruppen.....	83
4.4.2.	Modulation potentiell tumorrelevanter Gene .....	84
4.5.	Die IGF-Achse als therapeutische Zielstruktur .....	88
4.5.1.	Ausblick .....	90
5.	Zusammenfassung.....	91
6.	Literatur .....	93
7.	Anhang .....	110
7.1.	Tabellen regulierter Gene nach siRNA Transfektion.....	110
7.2.	Kurzzusammenfassung .....	157
7.3.	Abstract.....	158
7.4.	Erklärung gemäß der Promotionsordnung (§ 4 Abs. 1 Nr. 9) .....	159
7.5.	Danksagung.....	160
7.6.	Lebenslauf.....	161

Abbildung 1: Die humane Hepatokarzinogenese Schematische .....	3
Abbildung 2: vereinfachte Darstellung der IGF vermittelten Signaltransduktion.....	12
Abbildung 3: Schematische Darstellung der RNAi .....	17
Abbildung 4: Semiquantitative ‚ <i>realtime</i> ‘ PCR der IGF-II mRNA Expression nach siRNA Transfektion anhand verschiedener Transfektionsprotokolle.....	40
Abbildung 5: Einfluss der Zelldichte auf die siRNA-vermittelte IGF-II mRNA Reduktion .....	40
Abbildung 6: Einfluss der Inkubationsdauer und der Zugabe von Antibiotika auf die IGF-II mRNA Reduktion nach siRNA Transfektion.....	42
Abbildung 7: Einfluss der Menge IGF-II spezifischer siRNA und des Transfektionsreagenzes auf die genspezifische Inhibierung.....	43
Abbildung 8: Einfluss der FCS-Konzentration auf die Reduktion der IGF-II Expression .....	44
Abbildung 9: Zeitkinetik der mRNA Expression nach siRNA Transfektion .....	45
Abbildung 10: Relative IGF1R- und INSR-mRNA Expression nach siRNA Transfektion in Huh-7 .....	46
Abbildung 11: INSR/IGF1R-Proteinreduktion nach genspezifischer siRNA Transfektion .....	47
Abbildung 12: Doppelinhibierung des INSR/IGF1R mittels RNAi in Huh-7-Zellen .....	48
Abbildung 13: INSR- und IGF1R-Proteinreduktion in Hep3B nach siRNA Transfektion .....	48
Abbildung 14: Stat1 Phosphorylierungszustand nach siRNA Transfektion in Huh-7-Zellen .....	49
Abbildung 15: Einfluss der Rezeptorreduktion auf die Zellvitalität .....	50
Abbildung 16: Zusammenfassende Darstellung der FACS-Analyse siRNA transfizierter Huh-7- und Hep3B-Zellen .....	51
Abbildung 17: Phosphorylierungszustand von AKT/PKB nach Rezeptor Reduktion .....	52
Abbildung 18: IGF-II mRNA Konzentration nach Transfektion dreier IGF-II spezifischer siRNAs .....	53
Abbildung 19: Stat1 Aktivität und OAS-Expression nach siRNA Transfektion in Huh-7-Zellen .....	53
Abbildung 20: Einfluss der IGF-II Reduktion auf die Zellvitalität .....	54
Abbildung 21: Zellproliferation nach Reduktion der IGF-II-Expression .....	55
Abbildung 22: Zusammenfassende Darstellung der FACS-Analysen nach IGF-II-Reduktion in Huh-7- und Hep3B-Zellen .....	56
Abbildung 23: Phosphorylierungszustand der Signalproteine AKT/PKB und ERK1/2 .....	57
Abbildung 24: Proliferationsrate nach Rezeptor und Liganden-Reduktion durch siRNA Transfektion.....	58
Abbildung 25: Zusammenfassende Darstellung der FACS-Analyse nach siRNA Transfektion .....	59
Abbildung 26: Aktivität verschiedener mit der IGF-Achse assoziierter Kinasen nach siRNA Transfektion.....	61
Abbildung 27: Dendrogramm der Arra-Analysen .....	63
Abbildung 28: Validierung der mRNA Expressionswerte aus der Array-Analyse mittels ‚ <i>realtime</i> ‘ PCR.....	65
Abbildung 29: Vergleichende Darstellung der in den Array-Analysen und in der ‚ <i>realtime</i> ‘ PCR ermittelten mRNA-Expressionsprofile ausgewählter Zielgene .....	72
Abbildung 30: Einfluß der Celecoxib- und Cisplatinkonzentration auf die Vitalität von Huh-7 .....	74
Abbildung 31: Vitalitätsreduktion durch kombinierte siRNA- und Wirkstoffgabe .....	75
Abbildung 32: Rezeptorexpression in Huh-7 nach Celecoxibbehandlung .....	75
Abbildung 33: Auswahl regulierter zellulärer Funktionsgruppen und tumorrelevanter Gene .....	84
Abbildung 34: Funktion und Interaktion ausgewählter, durch die Inhibierung regulierter Gene.....	88

Tabelle 1: Zusammenfassende Aufstellung von Genen, die häufig im HCC dysreguliert vorliegen.....	5
Tabelle 2: Zusammenfassungen der Bedingungen der IGF-II siRNA Transfektion zur Optimierung der Transfektionsdauer und zur Überprüfung des Einflusses von Antibiotika.....	41
Tabelle 3: Anzahl der Gene, die nach siRNA-Transfektion reguliert vorlagen.....	64
Tabelle 4: Einzelne signifikant und biologisch relevant regulierte Gengruppen und ihre Schnittmengen.....	67
Tabelle 5: Funktionelle Gruppen und ihre Beeinflussung durch die siRNA-Transfektion.....	69
Tabelle 6: Auswahl einiger durch die genspezifische siRNA-Transfektion regulierter Gene.....	71
Tabelle 7: Zusammenfassung funktioneller und mechanistischer Aspekte einiger nach der Inhibierung dysregulierter Gene.....	85
Tabelle A: durch IGF1R-Inhibierung regulierte Gene.....	110
Tabelle B: durch INSR-Inhibierung regulierte Gene.....	117
Tabelle C: durch kombinierte Rezeptorinhibierung regulierte Gene.....	117
Tabelle D: durch IGF-II-Inhibierung regulierte Gene.....	121
Tabelle E: durch nonsense siRNA Transfektion regulierte Gene.....	122
Tabelle F: durch IGF1R- und AUCH durch IGF-II-Inhibierung regulierte Gene.....	128
Tabelle G: durch Rez. Mix und AUCH durch IGF-II-Inhibierung regulierte Gene.....	130
Tabelle H: durch IGF1R- und AUCH durch INSR-Inhibierung regulierte Gene.....	131
Tabelle I: durch IGF1R- und AUCH durch Rez. Mix-Inhibierung regulierte Gene.....	131
Tabelle J: durch Rez. Mix und AUCH durch INSR-Inhibierung regulierte Gene.....	134
Tabelle K: spezifisch durch IGF1R-Inhibierung regulierte Gene.....	134
Tabelle L: spezifisch durch INSR-Inhibierung regulierte Gene.....	142
Tabelle M: spezifisch durch IGF-II-Inhibierung regulierte Gene.....	143
Tabelle N: spezifisch durch Rez. Mix-Inhibierung regulierte Gene.....	144
Tabelle O: regulierter Gene funktioneller Prozesse.....	145

## Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
μ	Mikro (10 <sup>-6</sup> )
Abb.	Abbildung
AKT/PKB	Proteinkinase B
ALS	acid labil subunit
APS	Ammoniumperoxodisulfat
as	antisense
ATP	Adenosin-Triphosphat
Bad	Bcl2-agonist of cell death
BAX	Bcl2-associated X Protein
Bcl2	Oncogene B-cell Leukemia
BMP	bone morphogenic protein
bp	Basenpaar(e)
BrdU	Brom-desoxy-Uracil
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CBP/p300	CREB-binding protein
CDK	Cyclin dependent Kinase
cDNA	complementary DNA
COX-2	Cyclooxygenase 2
DKK1	Dickkopf1
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Deoxynucleotidtriphosphat
ds	doppelsträngig
DSH	Dishevelled
dsRNA	doppelsträngige RNA
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraazetat
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ERK	extracellular signal-regulated kinase 1 and 2
FACS	Fluorescentassociated Cell Sorting
FAM	5,6-Carboxyfluoreszin
Fos	Onkogen Fos
FOXO	Forkhead Box O
Gadd45	growth arrest and DNA-damage inducible gene
ggf.	gegebenenfalls
Grb2	growth factor receptor-bound protein 2
GSK3β	Glycogen Synthase Kinase 3-beta
HBV	Hepatitis B Virus
HBx	Hepatitis B Virus X-Protein
HCC	hepatozelluläres Karzinom
HCV	Hepatitis C Virus
HGF	Hepatocyte Growth Factor
IFN	Interferon
IGF	Insulin like growth factor
IGF1R	Insulin like growth factor typ 1
IGF2R	Insulin like growth factor typ 2
IGFBP	Insulin like growth factor binding protein
IGF-II	Insulin like growth factor 2
INSR	Insulin Rezeptor
IRS	Insulin Rezeptor Substrat
JNK	c-Jun Kinase 2
Jun	Onkogen Jun
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MAPKKK	mitogen activated protein kinase kinase kinase
MEK	mitogen-activated protein kinase kinase
MET	Hepatocyte Growth Factor Receptor

miRNA	micro RNA
MMP	Matrixmetalloproteinase
MnSOD	manganese superoxid dismutase
mRNA	messenger RNA
mTOR	Mammalian Target of Rapamycin
MW	Mittelwert
myb	Onkogen myb
myc	Onkogen myc
NFκB	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells
nt	Nukleotid(e)
p16 <sup>INK4A</sup>	Cyclin-dependet kinase inhibitor 2A
p53	Transforming-related Protein 53
PAA	Polyacrylamid
PAK	p21 activated Kinase
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDK	Pyruvat Dehydrogenase Kinase
PI	Propidium Iodid
PI3K	Phosphotidyl-Inositol 3 kinase'
PKR	interferon-inducedable double-stranded RNA-activated Protein Kinase
PLC <sub>γ</sub>	Phospholipase C, gamma'
PTEN	Phosphate and Tensin Homolog
PTGS	post transcriptional gene silencing
RAS	rat sarcoma viral oncogene homolog
rb1	Retinoblastom 1
RIN	RNA Integrity Number
RISC	RNA induced silencing complex
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	round per minute
RT	Raumtemperatur
Shc	Src homology 2 domain containing transforming protein'
shRNA	short hairpin RNA
Siah	seven in absentiah, drosophila homolog
siRNA	small inhibitory RNA
SMAD	mothers against DPP homolog 4 (Drosophila)
SOS	son of sevenless homolog'
Src	Avian sarcome virus, Onkogen Src
STAT	signal transducer and activator of transcription
Std.	Stunde
Std.-Abw.	Standardabweichung
TAMRA	Tetramethyl-6-carboxyrhodamin
TCF/LEF	T-cell Factor/Lymphoid Enhancer Factor
TGF- $\alpha$	transforming growth factor, alpha
TGF- $\beta$	transforming growth factor, beta
TIMP	tissue inhibitor of metalloproteinase
TNFAIP	tumor necrosis factor, alpha-induced protein
VEGF	vascular endothelial growth factor
vs.	versus
WNT	wingless-type MMTV integration site family
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

# **1. Einleitung**

## **1.1. Die Leber**

### **1.1.1. Aufbau und Funktion der Leber**

Mit einem Gewicht von 1,4-1,8 kg ist die Leber nach der Haut das zweitschwerste Organ des Körpers und als größte Drüse ein zentrales Organ des gesamten Stoffwechsels. Der mikroskopische Aufbau wird durch die 1-1,5 Mio. hexagonalen Leberläppchen (Lobuli hepatici) geprägt, die vorwiegend aus Hepatozyten bestehen. Zwischen den Hepatozyten liegen die Sinusoiden (erweiterte Leberkapillaren), welche die speziellen ortsständigen Makrophagen, die Kupffer-Zellen, enthalten. Im Spaltraum zwischen Sinusoiden und Leberzellen befinden sich die hepatischen Sternzellen, die Vitamin A speichern und extrazelluläre Matrix synthetisieren.

Die Leber ist sowohl für die Synthese lebenswichtiger Substanzen (z.B. Gerinnungsfaktoren), zur Speicherung (z.B. Glucose) und zum Abbau von Stoffwechselprodukten (z.B. Ammoniak) verantwortlich. Die Leber produziert unter anderem Cholesterol und die hieraus abgeleiteten Gallensäuren und speichert Blut, Fett in Form von Lipoproteinen und einige fettlösliche Vitamine (z.B. Vitamin D und E). Durch die Umwandlung von Glucose in Glycogen, welches als Energiereserve dient und bei Bedarf freigesetzt werden kann, reguliert die Leber den Blutzuckerspiegel unabhängig von der Nahrungsmittelzufuhr. Außerdem entfernen die Kupffer-Zellen geschädigte Erythrozyten durch Phagozytose und Ammoniakverbindungen werden zu wasserlöslichem Harnstoff umgebaut.

## **1.2. Das hepatozelluläre Karzinom**

Eine häufige und schwere Lebererkrankung ist das hepatozelluläre Karzinom (*hepatocellular carcinoma*, HCC), das in der Regel auf der Basis einer chronischen Leberentzündung (Hepatitis) oder Zirrhose entsteht. Da der Tumor selten auf Chemotherapeutika anspricht, bleiben als potentielle Therapie lediglich die Leberteilresektion und in wenigen Fällen auch die Lebertransplantation. Operative Verfahren sind jedoch nur bei ca. 5% der HCC-Patienten möglich, da zum Zeitpunkt der Diagnose häufig ein sehr fortgeschrittenes Tumorstadium vorliegt. Somit besteht bisher keine suffiziente Therapie und daher ist das HCC Gegenstand zahlreicher Forschungsprojekte.

### 1.2.1. Epidemiologie

Mit jährlich einer halben Million Neuerkrankungen weltweit ist das HCC das fünft-häufigste humane Malignom mit steigender Inzidenz (1). Die Prognose ist schlecht und die durchschnittliche 5-Jahres Überlebensrate nach Diagnosestellung liegt bei 3% (2, 3).

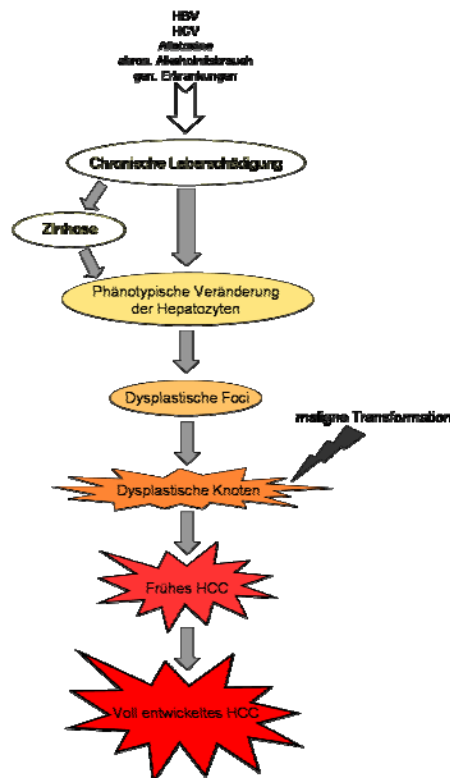
Außer der unterschiedlichen Erkrankungshäufigkeit zwischen den Geschlechtern, Männer erkranken doppelt so häufig wie Frauen an einem HCC (3), gibt es erhebliche Differenzen in der geographischen Verteilung. Achtzig Prozent der HCC-Erkrankungen sind in Entwicklungsländern zu verzeichnen (4); während in Nordamerika und Europa jährlich 1-3 Neuerkrankungen/100.000 Einwohner auftreten, sind es in Afrika südlich der Sahara und in Südostchina 50-150 Fälle/100.000 Einwohner (5). Eine Erklärung hierfür bietet die höhere Durchseuchung dieser Gebiete mit dem Hepatitis B Virus (HBV) und dem Hepatitis C Virus (HCV). Das HCC entwickelt sich basierend auf einer chronischen, meist viral bedingten Hepatitis und/oder einer Leberzirrhose (6). Tatsächlich korreliert die HCC Inzidenz mit der Prävalenz von HBV-Infektionen (7, 8). Eine Infektion mit HBV und HCV ist somit ein deutlicher Risikofaktor und erhöht die Erkrankungswahrscheinlichkeit um das 5-10fache im Fall einer HBV-Infektion und um das 17fache im Fall einer HCV-Infektion (9). Erste Impfstudien gegen HBV in Gebieten mit hoher HBV-Infektionsdichte belegen, dass durch die Einführung der universellen HBV-Impfung ein deutlicher Rückgang der HCC Erkrankungen verzeichnet werden kann (10). In den Industriestaaten gibt es trotz des geringeren Risikos einen Anstieg der Neuerkrankungen, wobei HCV die HBV Infektion als Hauptursache des HCCs verdrängt hat (11, 12). In Japan sind 80% der HCC-Erkrankungen mit einer chronischen Hepatitis C assoziiert (13), in Europa und den USA sind 30-60% der HCC-Patienten HCV-positiv (14-16).

Global gesehen ist die Aflatoxinbelastung eine der wichtigsten Ursachen für die Entstehung eines HCCs. Aflatoxine sind Mycotoxine der Schimmelpilze *Aspergillus flavus* und *Aspergillus parasiticus*, welche häufig in Entwicklungsländer Nahrungsmittel wie Mais, Reis und Erdnüsse kontaminieren (17). Außerdem findet sich der Schadstoff in der Milch und in Milchprodukten von Tieren, die mit Aflatoxin-verseuchtem Futter ernährt wurden. HBV-positive Personen mit Aflatoxin-Exposition haben ein 30fach höheres Risiko, ein HCC zu bilden als Menschen ohne Hepatitis B Infektion (18).

Weitere Ursachen für die Entstehung eines HCCs sind neben genetischen Stoffwechselerkrankungen wie Hämochromatose und seltener  $\alpha_1$ -Antitrypsinmangel, Autoimmunhepatitiden und primär biliäre Erkrankungen. Eine weitere häufige Ursache ist die alkoholische Leberzirrhose. Alkoholmissbrauch ist gerade in Europa und den USA eine

häufige Ursache für die Bildung einer Zirrhose, gefolgt von der Ausbildung eines HCCs (19, 20). In den USA liegt diese Ätiologie 15% der HCCs zugrunde (21).

Die humane Hepatokarzinogenese ist ein schrittweiser Prozess mit verschiedenen prämaligen Stadien, was mit der Beobachtung korreliert, das zwischen dem Auftreten der chronischen Lebererkrankung und der Manifestation eines HCCs häufig Jahre oder sogar Jahrzehnte liegen (22) (Abbildung 1).



**Abbildung 1: Die humane Hepatokarzinogenese**

Schematische Darstellung der sequentiellen Abläufe in der Hepatokarzinogenese

Durch oben genannte Ursachen kommt es zu einer chronischen Leberschädigung (z.B. Hepatitis), die häufig mit der Entstehung einer Zirrhose assoziiert ist. Über phänotypische Veränderungen und erhöhte Zellproliferation der Hepatozyten bilden sich zunächst dysplastische Foci (Durchmesser 0,1 cm), die als früheste prämale Vorläufer der HCC-Entstehung angesehen werden (23). Histologisch zeigen diese dysplastischen Läsionen bereits einige Charakteristika der HCCs (erhöhtes Kern-Zytoplasma Verhältnis, zytoplasmatische Basophilie), es gibt jedoch keine definitiven Anzeichen einer malignen Transformation (24). Aus den dysplastischen Foci entwickeln sich durch weiteres Wachstum dysplastische Knoten, die ebenfalls zu den prämaligen Läsionen gezählt werden. Im weiteren Verlauf der Tumorprogression kommt es zur malignen Transformation und zu Bildung „früher“ HCCs.



Diese unterscheiden sich durch ihre Größe (<2 cm), den hohen Differenzierungsgrad, langsames Wachstum und nicht invasives Verhalten von fortgeschrittenen HCCs (25).

Der initiale viral oder krankheitsbedingte Stimulus reicht für die Entstehung und die Progression des HCCs als alleinige Erklärung jedoch nicht aus. Hierfür sind die Dysregulation zellulärer Reparaturmechanismen, des regulierten Zelltods (Apoptose), der Proliferation und weiterer zellulärer Steuerungsmechanismen erforderlich (26).

### **1.2.2. Molekulare Mechanismen der Hepatokarzinogenese**

#### **1.2.2.1. Mutationen tumorrelevanter Gene**

Die intrazellulären Signalwege, welche Proliferation, Apoptose, genomische Integrität und Differenzierung vermitteln, umfassen tausende von Molekülen, deren veränderte Expression oder Struktur den Zellphänotypen nachhaltig verändern können. Einige dieser Moleküle sitzen an kritischen Knotenpunkten, die verschiedene zelluläre Prozesse miteinander verbinden (z.B. p53). Prinzipiell kann der Funktionsverlust von Tumorsuppressorgenen (z.B. *retinoblastom-1*) bzw. die Überexpression von Onkogenen (z.B. Cyclin D1, myc) dazu führen, dass Zellen unkontrolliert proliferieren und die Regulation durch Apoptose umgehen und somit der zellulären Wachstumskontrolle entkommen. (Auswahl einiger dysregulierter Signalwegskomponenten im HCC in Tabelle 1).

Mögliche Ursache für eine solche Änderung der Expression können chromosomale Zugewinne oder Verluste sein. Im HCC sind solche Allelverluste häufig auf den Chromosomen 8p (38%), 16q (35,9%), 4q (34,3%), 17p (32,2%) und 13q (26,2%) lokalisiert, während Zugewinne in den Regionen 1q (57,1%), 8q (46,6%), 6p (22,3%) und 17p (22,2%) vorkommen (22, 27). Dabei treten die Verluste der Chromosomenregionen 4q, 17p und 16q verstärkt in HBV-induzierten HCCs auf, was eine Ätiologie-assoziierte Veränderung des Wirtsgenoms vermuten lässt. Weiterhin erfolgen die verschiedenen chromosomalen Aberrationen zu verschiedenen Zeitpunkten der Tumorprogression. So können die genomischen Imbalancen der Region 1q, wenn auch in geringerer Frequenz, bereits in dysplastischen Knoten nachgewiesen werden (28), während die Verluste des Chromosomenarms 8p vermehrt in den späteren Progressionsstadien auftreten (29). Vielen der von genomischen Alterationen betroffenen Chromosomen-Regionen konnten verschiedene tumorrelevante Gene zugeordnet werden (z.B. *p53* auf 17p, *retinoblastom-1* auf 13q, *myc* auf 8q).

	Gen	Funktion	Dysregulation
Funktionsverlust wirkt protumorigen	<i>p16<sup>INK4A</sup></i>	Tumorsuppressorgen, CDK4 Inhibitor, verursacht Zellzyklusarrest	reduzierte Expression durch Promotor-hypermethylierung, Funktionsverlust durch Mutation und Deletion
	<i>p53</i>	Tumorsuppressorgen, vermittelt DNA-Reparatur, Zellzyklusarrest oder Apoptose	Funktionsverlust durch Mutation oder Deletion, LOH; <i>gain of function</i> assoziiert mit nukleärer Akkumulation und protumorigener Wirkung
	<i>tgf2r</i>	Tumorsuppressorgen, vermittelt IGF-II Degradation	Funktionsverlust durch Mutation oder Deletion
	<i>rb1</i>	Tumorsuppressorgen, Regulation des Zellzyklus	Funktionsverlust durch Mutation oder Deletion, LOH
	<i>pten</i>	PI3K Inhibitor	Expressionsreduktion durch Verlust der Promotoraktivität
	<i>axin 1&amp;2</i>	Komponenten des $\beta$ -catenin Degradationskomplexes	Funktionsverlust durch Deletion oder Mutation
Funktionsgewinn wirkt protumorigen	<i>myc</i>	Onkogen, Transkriptionsfaktor	<i>gain of function</i> durch Promotor-hypomethylierung oder Genamplifikation
	<i>cyclin D1</i>	Zellzyklusregulation, als Komplex mit CDK4 ein RB1 Inhibitor	Überexpression durch Amplifikation
	<i>cdk4</i>	Zellzyklusregulation, als Komplex mit Cyclin D1 ein RB1 Inhibitor	<i>gain of function</i> Überexpression oder Mutation
	<i>tgf-<math>\beta</math></i>	Ligand des mitoinhibitorischen TGF $\beta$ Signalwegs, inhibiert Wachstum und induziert Apoptose	seltener Funktionsverlust; protumorigene Funktion nach Hochregulation der Expression zusammen mit RAS
	<i>tgf-<math>\alpha</math></i>	Onkogen, Wachstumsfaktor, Stimulation der DNA Synthese	Überexpression
	<i>tgf-II</i>	fötaler Wachstumsfaktor, vermittelt Proliferation und Angiogenese	Transkriptionsaktivierung durch Verlust des genomischen Imprintings und der Promotorspezifität; erhöhte Bioverfügbarkeit durch Dysregulation interagierender Faktoren
	$\beta$ -catenin	durch Interaktion mit E-cadherin Funktion in der zellulären Adhäsion, Transkriptionsfaktor, Signalmolekül im WNT-Signalweg	ausbleibende Degradation durch Mutation oder Deletion der Phosphorylierungsdomäne oder Funktionsverlust des Degradationskomplexes; nukleäre Akkumulation
	<i>cox-2</i>	wandelt Arachidonsäure zu Prostaglandin um, fördert Proliferation, Invasion, Neoangiogenese und Antiapoptose	Überexpression, evtl. aufgrund Überrepräsentation des Genlocus durch Zugewinne der Chromosomenregion 1q

Tabelle 1: Zusammenfassende Aufstellung von Genen, die häufig im HCC dysreguliert vorliegen

Einige der in Tabelle 1 aufgeführten Tumorsuppressorgene und Onkogene werden nachfolgend detaillierter beschrieben und es wird auf die verschiedenen Formen ihrer Dysregulation im Rahmen der Hepatokarzinogenese eingegangen.

### retinoblastom-1 (rb-1)

Das Tumorsuppressorgen *rb-1* ist ein Zellzyklusregulator und kontrolliert den Übergang der G1 in die S-Phase. Die Kontrolle der Zellzyklusprogression erfolgt durch Bindung der Transkriptionsfaktoren der E2F-Familie, welche in ungebundener, aktiver Form die Expression von proliferationsrelevanten Genen induzieren. Die Aktivität des RB-1 Proteins

wird über die Phosphorylierung durch cyclinabhängige Kinasen (,cyclin dependent kinase', CDKs) reguliert, welche wiederum von verschiedenen CDK-Inhibitoren wie dem p16<sup>INK4A</sup>, dem p21<sup>CIP1</sup> oder dem p27<sup>KIP1</sup> blockiert werden. Die Phosphorylierung des RB-1 vermittelt die Freisetzung der Transkriptionsfaktoren gefolgt von DNA-Synthese und Zellzyklus-Progression.

Der in ca. 30% der HCCs beschriebene Funktionsverlust des RB-1 ist in der überwiegenden Zahl der beschriebenen Fälle mit dem Verlust des Genlocus 13q14 assoziiert (30), während Mutationen des Gens, die zum Funktionsverlust führen bisher kaum beschrieben wurden (31). Die fehlende oder reduzierte *rb-1* Expression führt zu einer erhöhten Bioverfügbarkeit der E2F-Faktoren und somit zu einer Steigerung der Proliferationsrate. Ebenfalls zum Verlust der Zellzykluskontrolle führt sowohl die Zunahme der RB-1 inhibierenden CDKs (z.B. CDK4) als auch die verringerte Bioverfügbarkeit der CDK-Inhibitoren, unter anderem verursacht durch den Expressionsverlust des p16<sup>INK4A</sup> durch Promoter-Hypermethylierung oder mit Mutationen assoziiertem Funktionsverlust (32).

### p53

Das Tumorsuppressorgen *p53* ist zentraler Regulator der Zellzykluskontrolle, der DNA-Reparatur und der Apoptose (33, 34). p53 ermöglicht der Zelle, auf genomische Schädigung zu reagieren, indem es durch die Induktion von Zellzyklusinhibitoren wie p21<sup>CIP1</sup> den Zellzyklusarrest bewirkt, sich direkt an der DNA-Reparatur beteiligt oder durch Stimulation spezieller proapoptotischer Gene wie BAX die Apoptose induziert. Ein Funktionsverlust des p53 ermöglicht somit Überleben und Proliferation von Zellen mit akkumulierenden Mutationen und begünstigt so die Tumorentstehung und Tumorprogression.

In rund 50% aller humanen Tumore und 30% der HCCs liegt ein solcher p53 Funktionsverlust vor (22, 35). Gründe hierfür sind zum einen der zuvor beschriebene Verlust des Genlocus 17p. Ebenso kann die Inaktivierung auch durch die Bindung des p53<sup>wt</sup> durch virale Proteine wie das Hepatitis B HBxAg verursacht werden (36, 37). Ferner führt eine gerade in Entwicklungsländern weit verbreitete Aflatoxin B1-assoziierte Mutation in Codon 249 zum Funktionsverlust des p53<sup>wt</sup> (38). Während diese Mutation nur in 4% der HCC Patienten in der westlichen Welt detektierbar ist, kann sie in Südchina und Afrika in 36% aller HCCs nachgewiesen werden. Aber nicht nur der Verlust des p53 (,loss of function') sondern auch ein protumorigen wirkender Funktionszugewinn (,gain of function') wurde für das HCC beschrieben. So wurde die Wirkung dieser ,gain of function' Mutation mit der Tumorgroße, dem Grad der Entdifferenzierung (39), erhöhter Proliferation (40) und einer gesteigerten Invasivität (41) korreliert.

### Cyclin D1

Das Onkogen *cyclin D1* ist ein zentraler Regulator des Zellzyklus und eine Komponente des Retinoblastom-1 Signalwegs. Zusammen mit CDK4 führt es als Komplex in der G1-Phase zur Hyperphosphorylierung des RB-1 Proteins und somit zur Freisetzung der gebundenen Transkriptionsfaktoren. Dieser Vorgang ermöglicht die Initiation der Replikation. In 10-20% der HCCs liegt Cyclin D1 amplifiziert und überexprimiert vor (22). Diese erhöhte Expression führt zu einer gelockerten Zellzykluskontrolle und korreliert ebenso wie die Überexpression weiterer Cycline (z.B. Cyclin A und E) mit schlechter Differenzierung, mikrovaskulärer Invasion, Metastasierung und erhöhter Proliferation (42, 43).

### COX-2

Die Cyclooxygenase-2 (COX-2) ist ein Enzym, das die Umsetzung von Arachidonsäure zu Prostaglandin katalysiert. COX-2 Aktivität ist mit Proliferation und Antiapoptose assoziiert und vermittelt Neoangiogenese und invasives Verhalten (44, 45). Es konnte gezeigt werden, dass die spezifische Inhibierung der COX-2 zur Aktivierung verschiedener Caspasen (z.B. Caspase 9 und Caspase 3) führt und Apoptose induziert (46). In 50-97% der HCCs konnte eine Überexpression von COX-2 nachgewiesen werden (47), welche unter anderem auf die Amplifikation der Chromosomenregion 1q25.2-q25.3, auf der *cox-2* lokalisiert ist, zurück zu führen ist (48).

#### **1.2.2.2. Dysregulation tumorassoziierter Signalwege**

Abgesehen von der Dysregulation einzelner Genprodukte, kann es im Rahmen der Hepatokarzinogenese zur Modifikation ganzer Signalwege kommen. Diese Veränderungen basieren in der Regel auf der Dysregulation einzelner Signalwegskomponenten.

### Wingless (WNT)-Signalweg

In 25-30% der HCCs wurde eine Dysregulation des hoch konservierten *wnt*-Signalweges beschrieben, der an der Regulation der Proliferation, der Motilität und der Organogenese beteiligt ist (49). Neben *myc* (Proliferation), *survivin* (Antiapoptose), Metalloproteinasen (*mmp-7*) (Invasion) und *vascular endothelial growth factor (vegf)* (Angiogenese) gehört auch *cyclin D1* zu den beschriebenen Zielgenen (50).

Die WNT-Liganden binden an einen der Frizzled-Rezeptoren und führen so zur Phosphorylierung des Protein Dishevelled (DSH), welches seinerseits die Glycogen Synthase Kinase 3 beta (GSK3β)-vermittelte Phosphorylierung und Ubiquitinierung des

zytoplasmatischen Co-Aktivators  $\beta$ -catenin inhibiert. Das phosphorylierte  $\beta$ -catenin wird anschließend durch das 26S Proteasom aktiv degradiert. Daneben wurde ein weiterer phosphorylierungsunabhängiger Weg über die p53 induzierbare Ubiquitin-Ligase seven in absentia homolog (SIAH) beschrieben (51). Wird  $\beta$ -catenin nicht degradiert, kommt es zu einer Akkumulation des stabilisierten Proteins im Zellkern, wo es mit den Transkriptionsfaktoren TCF/LEF einen Komplex bildet (52) und so die Expression der Zielgene induziert.

Je nach Studie weisen bis zu 40% der HCCs eine nukleäre  $\beta$ -catenin Akkumulation auf (53-56). Daneben existieren zahlreiche beschriebene Mechanismen, die zu einer Anreicherung des  $\beta$ -catenins in HCC-Zellen führen können. Zu diesen zählen die Mutation des Axin 1 und Axin 2, Komponenten des Degradationskomplexes (57).

#### TGF $\beta$ -Signalweg

Der TGF $\beta$ -Signalweg ist ebenfalls in die Proliferationskontrolle involviert. Zur Gruppe der Liganden gehören unter anderem TGF $\beta$ 1-3 und die bone morphogenic proteins (BMP) (58), die an die TGF $\beta$  Rezeptoren Typ I-III binden, und bei der Proliferationshemmung und Apoptose der Hepatozyten von Bedeutung sind. Die Aktivierung des Rezeptors führt zur Phosphorylierung der SMAD (*Mothers against decapentaplegic*), Transkriptionsfaktoren, welche in den Kern translozieren und dort nach Komplexbildung mit anderen Co-Regulatoren, wie CBP/p300 (59), die Expression von antiproliferativen Genen wie den CDK-Inhibitoren induzieren. Weitere Zielgene des TGF $\beta$  induzierten Transkriptionskomplexes sind in die negative Feedback-Regulation involviert (z.B. SMAD-7), welche in die Ubiquitin-abhängige Degradation des TGF $\beta$  Rezeptors Typ 1 mündet (60).

Obwohl damit die Inaktivierung des TGF $\beta$ -Signalweges potentiell protumorigene Effekte zu vermitteln scheint, sind inaktivierende Mutationen selten beschrieben (61). Stattdessen wird eine proinvasive, tumorfördernde Rolle des TGF $\beta$  in Abhängigkeit vom Vorhandensein des Onkogens RAS diskutiert (62). Publierte Daten deuten darauf hin, dass die protumorigenen Effekte auf eine verbesserte Neo-Angiogenese und Tumorzellinvasivität zurückzuführen sind (22).

#### HGF/MET-Signalweg

Der Hepatocyte Growth Factor (HGF) ist der potenteste Wachstumsfaktor für Hepatozyten und vermittelt nach der Bindung an den MET-Rezeptor Proliferation (63), Migration (64) sowie *Survival* (65) und Angiogenese (66). Nach der HGF Bindung kommt es zur Rezeptortetramerisierung, gefolgt von der Auto- und Paraphosphorylierung verschiedener

Adapterproteine und der Aktivierung verschiedener Downstream-Effektoren wie PLC $\gamma$ , PI3K oder ERK (67). Zwar ist in 70% der HCCs eine MET-Expression nachweisbar, jedoch liegt im Vergleich zum peritumorösen Gewebe nur in 20-48% der Fälle eine Überexpression vor (68). Die Rezeptorüberexpression ist in 16,8% aller HCCs mit einem Zugewinn des Chromosomenarms 7q assoziiert (27). Der Ligand HGF, der Tumorzellen zur Invasion stimuliert, konnte im HCC als hochreguliert nachgewiesen werden (69-71), obwohl er nicht von den Tumorzellen selbst, sondern durch diese induziert von hepatischen Sternzellen und Myofibroblasten synthetisiert wird.

### **1.3. IGF-Achse**

Der Insulin like Growth Factor (IGF) Signalweg ist sowohl in der embryonalen Entwicklung wie auch im Adulten von zentraler Bedeutung. Über ihn werden Antiapoptose, Proliferation und Zelldifferenzierung vermittelt. Zu den Mitgliedern der IGF-Achse gehören neben den Liganden IGF-I und IGF-II und den verschiedenen Rezeptoren (der signaltransduzierende Insulin- und IGF1-Rezeptor und der regulatorische IGF2 Rezeptor) auch Bindeproteine (IGFBP 1-6) und Bindeprotein-Proteasen, die die Bioverfügbarkeit der Liganden regulieren.

#### Liganden

Die jeweils 7,5 kD großen IGF-I und IGF-II Peptide sind auf Aminosäureebene zu 70% identisch (72, 73). Während IGF-I hauptsächlich von Hepatozyten produziert und sezerniert wird (74), erfolgt die Produktion von IGF-II in Hepatozyten ebenso wie in Kupfferschen Zellen, Endothelzellen und hepatischen Stern-Zellen (75). Die IGF-II Synthese wird durch transkriptionelle Repressoren der Promotorregion und damit verbundene gewebs- und entwicklungsspezifische Promotoraktivität (76, 77), zwei Polyadenylierungssignale (78) und genomisches Imprinting reguliert (79). Vier verschiedene Promotoren P1-P4 vermitteln die IGF-II Expression, welche in allen normalen Geweben mit Ausnahme der adulten Leber aufgrund des Imprintings monoallelisch ist (80). In der fötalen Entwicklung werden große Mengen IGF-II von den Promotoren P2-P4 exprimiert. (81). Nach der Geburt verändert sich die Aktivität der Promotoren maßgeblich und der IGF-II Spiegel sinkt. Während die Synthese durch die Promotoren P2-P4 weiterhin monoallelisch bleibt, aber deutlich reduziert wird, kommt es in der adulten Leber zu einer biallelischen Expression durch den P1 Promoter (76, 81, 82).

### IGF-Bindeproteine (IGFBPs)

Durch Bindung der Liganden können die verschiedenen Bindeproteine die Bioverfügbarkeit und somit die Bioaktivität der Wachstumsfaktoren maßgeblich beeinflussen und so IGF-vermittelte Effekte in Abhängigkeit vom physiologischen Kontext steigern oder reduzieren (83). In der Leber werden IGFBP-1, -2 und -4 wie auch das ‚acid-labile subunit‘ Protein (ALS) von Hepatozyten synthetisiert und sezerniert, während IGFBP-3 außerdem von Kupfferschen Zellen, Endothelzellen und hepatischen Stern-Zellen produziert wird (75). IGFBP-1-4 wirken antiproliferativ und binden IGF-I und IGF-II mit gleicher Affinität, während IGFBP-5 und IGFBP-6 eine 10fach höhere Affinität zu IGF-II besitzen (84, 85). Insgesamt liegen rund 99% des im Blut zirkulierenden IGF-II gebunden vor, wobei 75% auf einen ternären Komplex aus IGFBP-3, IGF-II und dem stabilisierend wirkenden ALS entfallen (86, 87).

### IGFBP-Proteasen

Alle sechs Bindeproteine sind Substrat für die Spaltung durch IGFBP-Proteasen und ihre proteolytische Spaltung ist mit einer erhöhten IGF Freisetzung und Aktivität assoziiert (88, 89). Außer Cathepsin, welches spezifisch IGFBP-3 spaltet (90) gehören unter anderem Plasmin und MMPs zu den Bindeprotein-Proteasen (83, 91).

### Rezeptoren

Neben der Kontrolle der IGF-Bioverfügbarkeit durch inhibierende Proteinkomplexierung vermittelt der IGF2R eine Regulation der IGF Konzentration. Nach der Bindung des Wachstumsfaktors kommt es zur Internalisierung des Liganden-Rezeptorkomplexes und zur lysosomalen Degradation (92, 93). Zusätzlich zum membranständigen IGF2R gibt es eine lösliche Isoform, die durch die Abspaltung eines 20 kD carboxyterminal gelegenen Teils entsteht. Dieser frei zirkulierende Rezeptorteil besitzt die Fähigkeit, IGF-II extrazellulär zu binden und so ebenfalls die Abnahme der Bioverfügbarkeit zu bewirken (94, 95).

Im Gegensatz zum nicht signaltransduzierenden IGF2R haben die Rezeptoren IGF1R und eine spezielle Splicevariante des INSR, die INSR Isoform A (96), die Fähigkeit, mitotische und antiapoptotische Signale zu vermitteln. Beide Rezeptoren gehören zur Gruppe der Rezeptortyrosinkinasen und bestehen aus einer extrazellulären  $\alpha$ -Untereinheit und einer transmembranären, katalytischen  $\beta$ -Untereinheit, die ein Rezeptormonomer bilden (97). Die Bindung des Liganden an die  $\alpha$ -Untereinheit führt zu einer Dimerisierung der

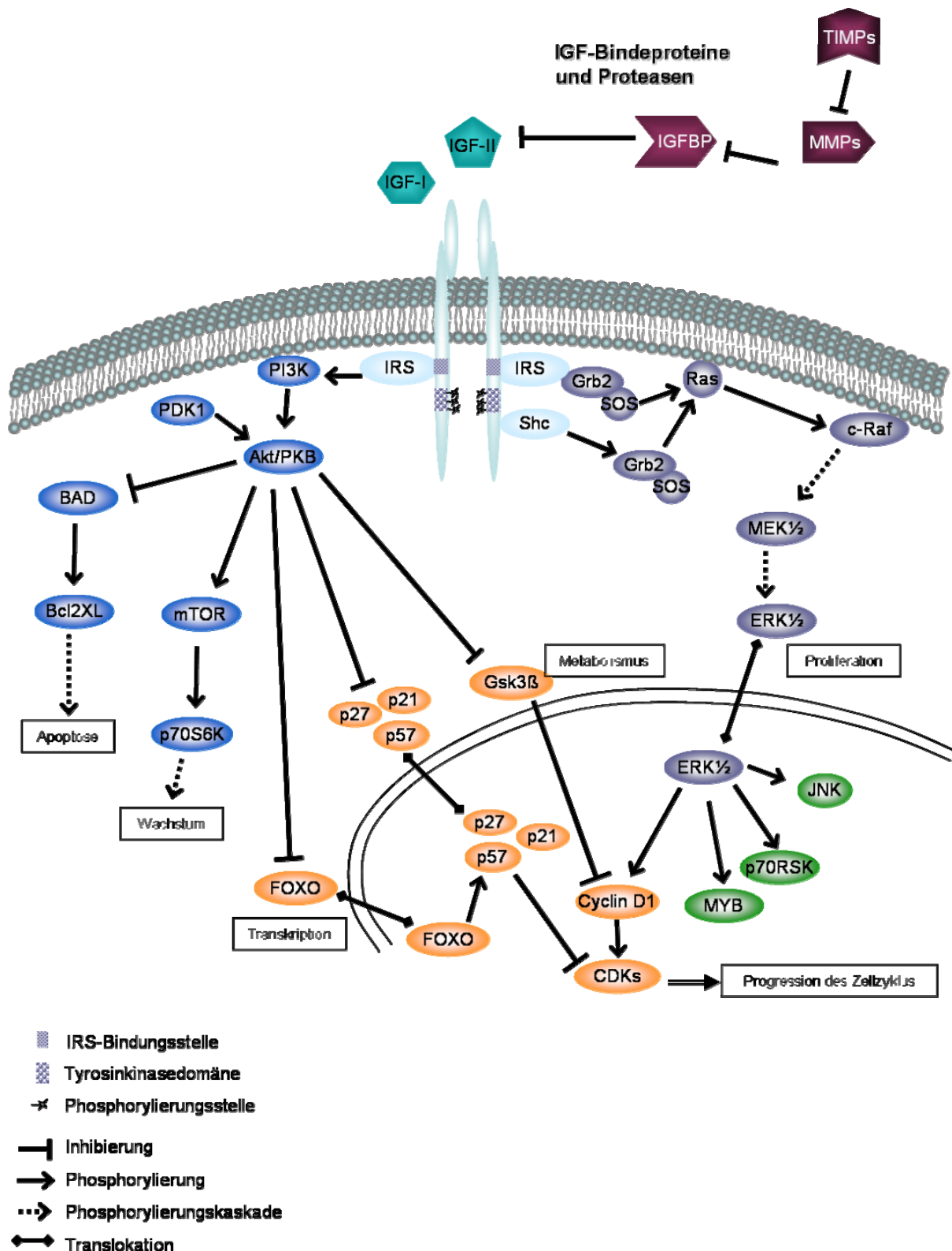
Rezeptormonomere, was eine Konformationsänderung bewirkt. Dadurch wird ein Pseudosubstrat-Protein-Loop der intrazellulären Rezeptordomäne aus dem aktiven Zentrum der Tyrosinkinase entfernt. Durch diese Aktivierung kommt es zu einer gegenseitigen trans-Phosphorylierung der beiden Rezeptormonomere (98). Favelyukis und Kollegen konnten mittels Röntgenstrukturanalysen im ‚*activation loop*‘ drei Tyrosinreste identifizieren, deren sequentielle Phosphorylierung zur Aktivierung des katalytischen Zentrums führt (99). Außer den beiden bisher erwähnten Rezeptoren sind auch Hybridrezeptoren, bestehend aus je einem INSR und einem IGF1R Monomer, in der Lage, IGFs zu binden und Signalkaskaden zu induzieren.

### IGF-Signaltransduktion

Die IGF-vermittelte Signaltransduktion erfolgt unter anderem über die Komponenten des MAPK (mitogen activated protein kinase)-Signalweges wie auch über PI3K (Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase)-Signalwegskomponenten.

Die MAPK Signaltransduktionskaskade wird durch die Bindung der ‚*Src homolgy*‘ (SH2) Domäne des ‚*Growth factor receptor-bound protein 2*‘ (Grb2) Adaptermoleküls an den Rezeptor oder an das Rezeptor-gebundene Insulin Rezeptor Substrat (IRS) aktiviert. Grb2 rekrutiert ‚*son of sevenless*‘ (SOS) und dieser Komplex interagiert mit RAS und aktiviert dieses Protein, das zur Gruppe der kleinen, monomeren G-Proteine gehört (100). Aktives Ras initiiert die RAF-Phosphorylierung, indem es das normalerweise im Zytoplasma vorliegende Protein an die Zellmembran transloziert (101). Dort kommt es unter anderem durch Mitglieder der Src-Kinasen-Familie und der ‚*p21-activated protein kinase*‘ (PAK) zur Phosphorylierung (102). RAF gehört zur Gruppe der MAPKKK (*Mitogen activated protein kinase kinase kinase*) und ist ein Protein einer Signalkaskade, in der nachfolgend unter anderem MEK und ERK aktiviert werden (101, 103). ERK wiederum phosphoryliert verschiedene Substrate, was zur Aktivierung der Proteinsynthese, zur Induktion von Genexpression oder strukturellen Veränderungen des Zytoskeletts führt. Durch ERK kommt es zur Transkription „früher“ Gene wie JUN, FOS, MYC und MYB, die wiederum die Expression verschiedener für die Zellzyklusprogression benötigter Gene induzieren (103, 104).





**Abbildung 2: vereinfachte Darstellung der IGF vermittelten Signaltransduktion**

In dieser vereinfachten Illustration der IGF-Achse sind ausgewählte Signalmoleküle, Transkriptionsfaktoren und Zielgene dargestellt. Die Komplexität der Abläufe und weitere Wechselwirkungen verschiedener Moleküle untereinander wurden dabei nicht berücksichtigt. Die funktionelle Zuordnung erfolgte in Anlehnung an Foulstone (105)

Die Aktivierung der signaltransduzierenden Rezeptoren führt ebenfalls zur Rekrutierung der PI3K an die Zellmembran. Anschließend wird die Proteinkinase B (AKT/PKB) durch PI3K an die Zellmembran transloziert, wo es zu einer Konformationsänderung und der PDK (Pyruvat Dehydrogenase Kinase)-vermittelten Phosphorylierung zweier Tyrosinreste kommt (106). Nach der Aktivierung dissoziiert AKT/PKB von der Plasmamembran und es kommt zur Phosphorylierung zahlreicher Substrate im Zytoplasma ebenso wie im Nucleus (107). Unter anderem reguliert AKT/PKB so die Transkription von p27<sup>Kip1</sup>. Eine erhöhte AKT/PKB Aktivität führt zu einer dauerhaften Phosphorylierung des Inhibitors, der dadurch nicht in den Nucleus transloziert und deshalb nicht die CDK-Funktion blockieren kann; es kommt zur Zellzyklusprogression (108, 109). Ein weiterer Effekt der AKT/PKB-Aktivierung ist die inhibierende Phosphorylierung von GSK3 $\beta$  (110). Diese führt zu einem Anstieg des Cyclin D1 im Nucleus und somit ebenfalls zu einer Begünstigung der Proliferation (111), da die GSK3 $\beta$ -vermittelte Phosphorylierung und der damit verbundene Kern-Export des Cyclins blockiert ist. Darüber hinaus kann aktiviertes AKT/PKB Apoptose inhibieren. Die Kinase phosphoryliert unter anderem entweder das proapoptotische Bcl2-Familienmitglied Bad und verhindert somit die durch Bcl-X<sub>L</sub> Bindung initiierte Apoptose (112) oder inhibiert direkt die Caspasen, Hauptakteure der Apoptose, durch Phosphorylierung (113). Einen direkten Einfluss auf die Genregulation hat AKT/PKB durch die Regulation der Transkriptionsfaktoren der ‚Forkhead box class O‘ (FOXO) Familie (114, 115), die unter anderem die Expression des proapoptotischen Bcl2 Familienmitglieds Bim (116), p27<sup>KIP1</sup> (117), Cyclin B, Gadd 45 und MnSOD (118) modifizieren.

#### **1.4. IGF-Achse in der humanen Karzinogenese**

Zahlreiche Dysregulationen von Komponenten der IGF-Achse sind in Zusammenhang mit verschiedenen Tumorentitäten beschrieben worden. So korreliert ein erhöhter IGF-I Spiegel im Blut-Serum mit einem erhöhten Risiko an Prostata-, Brust-, Darm- und Lungenkrebs zu erkranken (119). Die reduzierte IGF2R Expression in Verbindung mit einer erhöhten IGF1R- und IGF-II-Synthese ist für verschiedene adulte und pädiatrische Tumore beschrieben worden (120). In murinen HCC-Modellen konnte gezeigt werden, dass eine gesteigerte IGFBP-3 Aktivität ebenso wie eine Inhibierung der Bindeprotein-Proteasen und der damit verbundene IGFBP Anstieg die IGF-II Bioaktivität deutlich reduziert, was ein geringeres Tumorwachstum zur Folge hat (121).

In der humanen Hepatokarzinogenese konnte eine pathophysiologische Verbindung zwischen dem Liganden IGF-II und der Tumorzellproliferation gezeigt werden (122). Eine erhöhte

Bioverfügbarkeit des Wachstumsfaktors kann durch drei verschiedene Arten der Dysregulation zustande kommen, (i) die reduzierte IGFBP- (ii) sowie IGF2R-Konzentration und (iii) die verstärkte Expression des Liganden haben eine gesteigerte IGF-II-Bioverfügbarkeit zur Folge. Eine signifikante Reduktion der IGFBP-1, -3 und -4 wurde bereits im HCC beschrieben (123), wobei einem Drittel der Fälle der verminderten IGFBP-3 Expression eine Hypermethylierung des Promotors zugrunde lag (124). In einer Studie wurde bei 63% der Patienten eine Reduktion des IGF2R im HCC-Gewebe nachgewiesen (125), in den USA sind rund 70% der HCC mit einem Allelverlust am *igf2r* Locus und einer Mutation im verbleibenden Allel assoziiert (126). Diese Beobachtung wird jedoch kontrovers diskutiert, denn Arbeitsgruppen um Enomoto, Saeki und Wada konnten eine solche Reduktion in ihrem jeweiligen Patientenkollektiv nicht bestätigen (127-129).

Die IGF-II Überexpression kann verschiedene Ursachen haben. Sie scheint ein frühes Ereignis in der Hepatokarzinogenese zu sein, denn sie kann bereits in dysplastischen Foci und in ca. 40% der HCCs beobachtet werden (130-133). Zum einen konnte gezeigt werden, dass im HCC eine verstärkte Aktivität des fötalen P3 Promotors vorliegt (133). Diese scheint mit einer allelischen Imbalance und teilweise einem Re-Imprinting des maternalen Allels einherzugehen (134, 135), was zum Wiedererlangen des fötalen Expressionsmusters führen kann. In 43% der dysplastischen Knoten, 78% der gut und 89% der mäßig differenzierten HCCs konnte eine dysregulierte Expression beider Allele nachgewiesen werden (136).

Zahlreiche Verbindungen zwischen der IGF-II Überexpression und im HCC dysregulierten Signalwegen (z.B. WNT-Signalweg) wie auch eine Assoziation mit HCC-Risikofaktoren (z.B. virale Hepatitis) konnten gezeigt werden. So führt die IGF1R-Signaltransduktion zu einer Inaktivierung von GSK3 $\beta$ , was eine Translokation des  $\beta$ -catenins in den Zellkern als Folge der Aktivierung des WNT-Signalwegs bewirken kann (137). Ein Zielgen dieses aktivierten WNT-Signalwegs sind die Matrixmetalloproteinasen, welche wiederum zu einer Degradation der Bindeproteine führen, was eine erhöhte IGF-II Verfügbarkeit zur Folge haben kann (138). Die Aflatoxin-induzierte p53 Mutation p53<sup>mt249</sup> führt zu einer verstärkten IGF-II- und IGF1R-Expression (139). Einige Arbeiten finden eine Korrelation der erhöhten IGF-II-Expression mit HBV- und HCV-assoziiierter Zirrhose (140, 141), was in der Induktion der Promotor P4 vermittelten IGF-II-Synthese durch das HCV ‚core‘ Genprodukt begründet sein kann (142), während andere Studien keinen Zusammenhang finden konnten (131).

Auch für die anderen Komponenten der IGF-Achse wurden biologisch relevante Veränderungen beschrieben. So könnte eine für das HCC gezeigte Überexpression des IRS1 Adapterproteins wie im Mausmodell zu einer konstitutiven Aktivierung der RAF/MEK/ERK

Signalkaskade führen (143, 144). Eine erhöhte IGF1R-Expression wird durch das HBx Protein verursacht (145), was ebenso wie der Verlust des PI3K Inhibitors PTEN in 10% aller HCC zu einer verstärkten Signaltransduktion führt (146, 147).

Aufgrund der zahlreichen beschriebenen Dysregulationen verschiedener Komponenten der IGF-Achse, im besonderen IGF-II als am stärksten reguliertes Gen im HCC (131), stellt die IGF-II vermittelten Signaltransduktion ein viel versprechendes Ziel für therapeutische Ansätze dar. Die unterschiedlichen Strategien, die in verschiedenen Modellsystemen zur Modulation des IGF-Signalwegs entwickelt werden, unterscheiden sich jedoch bezüglich ihrer Effektivität und Spezifität erheblich (siehe Diskussion). Als eine geeignete Methode erscheint die *RNAinterference* (RNAi), welche das gezielte Ausschalten sowohl des Liganden wie auch der einzelnen signaltransduzierenden Rezeptoren ermöglicht.

### **1.5. RNAinterference**

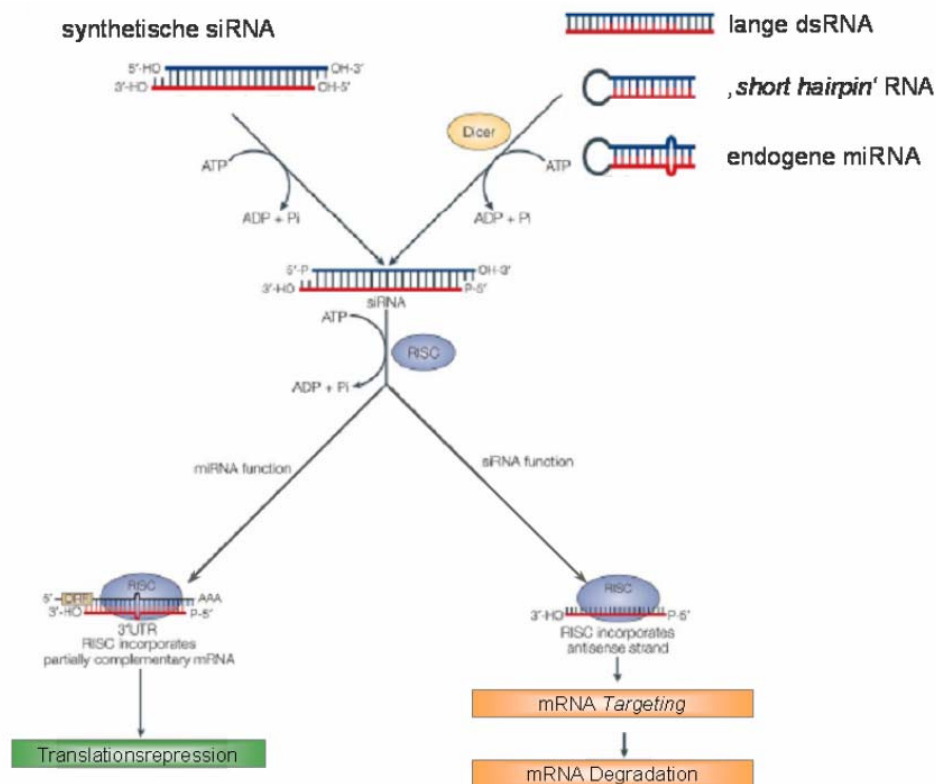
Die *RNAinterference* (RNAi) ist ein Prozess, bei dem eine genspezifische doppelsträngige RNA (dsRNA) die Synthese eines Genproduktes durch die Degradation der mRNA verhindert. Dabei handelt es sich um einen endogenen, natürlichen Vorgang, der durch dsRNA Moleküle verschiedener Länge und Struktur induziert werden kann. In Pflanzen ist der Mechanismus als ‚posttranskriptionelles Gene Silencing‘ (PTGS) bekannt und schützt diese vor viralen Infektionen (148). Im Jahr 1998 wurde von Fire und Mello erstmals eine Methode beschrieben, bei der es durch eine gezielt eingebrachte dsRNA zum spezifischen Ausschalten der Expression eines Genproduktes in *C. elegans* kam (149). Bei diesem, von ihnen *RNAinterference* genannten Vorgang, schien es sich um einen katalytischen Prozess zu handeln, denn nur wenige Moleküle waren ausreichend, um die Expression des komplementären Gens aufzuheben. Dieser Entdeckung folgten genauere Untersuchungen des zugrunde liegenden Mechanismus. Hamilton und Baulcombe konnten in *Arabidopsis* kurze 21-25 nt lange dsRNAs als Effektormoleküle identifizieren, die aus einer langen dsRNA prozessiert worden waren und deren Sequenz komplementär zu der der degradierten mRNA war (150). Dieser zweistufige Ablauf, zunächst die Prozessierung der eingebrachten dsRNA gefolgt von der Degradation der mRNA, wurde auch in *C. elegans* nachgewiesen. Die durch das Enzym Dicer (RNase) prozessierte dsRNA wies mit ihren 21-23 nt Länge und 2 Nucleotiden 3'-Überhang eine spezielle Struktur auf und wurde als ‚*small interfering*‘ RNA (siRNA) bezeichnet (151, 152). Obwohl sich RNAi in *C. elegans* und anderen niederen Eukaryoten schnell als gängige Methode zur gezielten Reduktion einzelner Gene durchsetzte (153, 154), wurde angenommen, dass sie in Säugerzellen keine Anwendung findet. Dort

aktivieren dsRNA-Moleküle, die länger als 30 bp sind, einen unspezifischen Interferon (IFN)-Signalweg, aus dem die prinzipielle Reduktion der Proteinbiosynthese resultiert (155). Diese Ansicht wurde im Jahr 2001 durch die Arbeit von Tuschl und Kollegen revolutioniert. Sie konnten zeigen, dass synthetische siRNA-Moleküle in Säugetierzellen genspezifische RNAi induzieren, ohne eine IFN-Antwort auszulösen (152, 156). Im Gegensatz zu Invertebraten und anderen niederen Eukaryoten wird eine nach dem Vorbild der endogen prozessierten Effektormoleküle chemisch synthetisierte siRNA eingebracht (transfiziert). Obwohl in den ersten Experimenten keine unspezifischen Effekte beobachtet wurden, beschrieben anschließend einige Gruppen trotzdem die Induktion einer unspezifischen IFN-Antwort (157-159).

Neben der siRNA und der langen dsRNA wurden weitere doppelsträngige RNAs als Effektormoleküle entdeckt. Sowohl in der Fliege, im Wurm wie auch im Menschen konnten zahlreiche endogene RNA Moleküle beschrieben werden, die zunächst als ‚*Hairpin*‘-Struktur vorliegen (160-162). Aus diesem ‚*Hairpin*‘ wird durch das Dicer Enzym dsRNA prozessiert. Aufgrund ihrer regulatorischen Funktion und der Ähnlichkeit zu der siRNA werden diese endogenen RNAs als microRNA (miRNA) bezeichnet. Die durch die Bindung der miRNA an die mRNA verursachte sterische Hinderung führt dazu, dass miRNAs partiell homologe Gene verstärkt durch die Blockade der Proteinbiosynthese inhibieren (155, 159, 163).

Während man dem Wurm *C. elegans* die dsRNA Moleküle durch Fütterung oder Injektion verabreicht, bedarf die Anwendung der siRNA in der eukaryotischen Zellkultur chemischer und physikalischer Techniken. Die Einbringung der siRNA und der miRNA kann sowohl durch Elektroporation oder lipophile Reagenzien erfolgen (ausschließlich in der Zellkultur anwendbar; (164-166), als auch durch die Transfektion (und Integration) ‚*short hairpin*‘ RNA (shRNA) exprimierender Plasmide und viraler Vektoren (155, 167, 168). Im Mausmodell ist die Applikation der siRNA auch durch Injektion in die Schwanzvene möglich, wobei verschiedene Organe eine unterschiedlich starke Anreicherung der siRNA und somit eine unterschiedlich starke Reduktion der Genexpression aufweisen (169, 170).

Der Mechanismus der RNAi ist, unanhängig vom verwendeten Effektormolekül, in allen Organismen identisch (dargestellt in Abbildung 3). dsRNA wird, ggf. nach der Prozessierung, am 5'-Ende phosphoryliert und in den ‚*RNAi induced silencing complex*‘ (RISC) eingebaut, in dem durch ATP-abhängige RNA-Helicase Aktivität die dsRNA zu Einzelsträngen entwunden wird (171). Der ‚*antisense*‘ Strang der Duplex verbleibt im RISC und führt diesen zur homologen Zielgen- mRNA.



### Abbildung 3: Schematische Darstellung der RNAi

Doppelsträngige RNA wird zu einer 21 nt langen siRNA prozessiert und führt in der Zelle je nach Homologie zur mRNA Degradation oder zur Blockade der Proteintranslation (Abbildung modifiziert aus Vivek Mittal, Nature Reviews in Genetics 2004)

Bei nur partieller Homologie zur mRNA kommt es zur Repression der Proteintranslation, die antisense RNA wirkt als miRNA (155, 159). Bei vollständiger Homologie kommt es hingegen zur Degradation der mRNA durch die mit dem RISC assoziierte Endoribonuclease, die RNA wirkt als siRNA (152, 172). Nach der Spaltung der mRNA verbleibt der ‚antisense‘ Einzelstrang der Duplex im RISC und kann die Degradation weiterer homologer mRNA Moleküle katalysieren (173).

## 1.6. Zielsetzung

Das hepatozelluläre Karzinom (*hepatocellular carcinoma*, HCC) ist eine der weltweit häufigsten Tumorerkrankungen. Da zum Zeitpunkt der Diagnose bei den meisten Patienten ein fortgeschrittenes, inkurables Tumorstadium vorliegt, sind insbesondere das Verständnis der Progressionsmechanismen und ihre potentielle therapeutische Beeinflussung von zentraler wissenschaftlicher Bedeutung. So ist die Überexpression des Wachstumsfaktors *insulin-like growth factor* (IGF)-II und die damit verbundene erhöhte Aktivität des IGF-Signalweges in bis zu 40% aller HCCs dokumentiert worden. Aufgrund der durch diesen Signalweg vermittelten protumorigenen biologischen Effekte (Proliferation, Antiapoptose und Angiogenese) stellt dieser Signalweg einen möglichen therapeutischen Angriffspunkt dar.

Im Rahmen dieser Arbeit sollen verschiedene Komponenten des IGF-Signalweges hinsichtlich ihrer protumorigenen Funktion und potentieller therapeutischer Optionen in HCC-Zellen analysiert werden. Dazu sollen sowohl der Ligand IGF-II als auch die signaltransduzierenden Rezeptoren IGF1-Rezeptor (IGF1R) und Insulin-Rezeptor (INSR) mittels *RNAinterference* in verschiedenen HCC Zelllinien spezifisch inhibiert werden. Nach der Etablierung des Protokolls und dem Nachweis der erfolgten Inhibierung sollen sowohl die Effekte auf den Phosphorylierungsstatus von typischen zytoplasmatischen Signalwegskomponenten als auch die Auswirkung auf funktionelle Aspekte wie Proliferation und Apoptose untersucht werden. Durch die vergleichende Analyse der spezifischen Expressionsprofile nach Inhibierung von IGF-II und den Rezeptoren IGF1R und INSR sollen exklusive und redundante Zielstrukturen der Signalwegskomponenten identifiziert und verifiziert werden.

Ziel dieser Arbeit ist es somit, mit Hilfe der *RNAi*-vermittelten Modulation von verschiedenen IGF-Signalwegskomponenten mechanistische und funktionelle Unterschiede zwischen diesen potentiellen Zielstrukturen in HCC-Zellen zu identifizieren und die theoretische Grundlage für hochspezifische und nebenwirkungsarme Therapieansätze zu legen.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Material

#### 2.1.1. Verwendete Lösungen, Chemikalien und Kits

Produkt	Hersteller
Standardchemikalien (soweit nicht anders vermerkt)	Bio-Rad (München) BD-Bioscience (Heidelberg) Merck (Darmstadt) Roche (Mannheim) Roth (Karlsruhe) Sigma (Deisenhofen)
Einwegpipetten, Pipettenspitzen und Reaktionsgefäße	Eppendorf (Hamburg) Greiner (Nürtingen) ABImed (Langenfeld)
Plastikware Zellkultur	Greiner (Nürtingen) Falcon (Heidelberg) Nunc <sup>TM</sup> (Wiesbaden) TPP (Basel, Schweiz)
Medien und Zusätze für die Zellkultur	PAA Laboratories (Cölbe)
Vollentsalztes Wasser für Lösungen (Reinstwassersystem Ultra Clear/Integra)	SG Wasseraufbereitung und Regenerierstation (Barsbüttel)
ultraPure <sup>TM</sup> RNase freies Wasser für molekulare Analysen	Invitrogen (Karlsruhe)
Enzyme und Puffer, dNTPs und <i>Random-Primer</i>	MBI Fermentas (St. Leon-Rot)
TaqMan Sonden-Master Mix	Eurogentec (Seraing, Belgien)
TaqMan SYBR <sup>®</sup> Green-Master Mix	ABImed (Langenfeld)
BrdU-Proliferations-ELISA	Amersham Bioscience (Freiburg)
Vitalitäts-Test (MTT-Test)	EZ4U, Biomedica (Wien, Österreich)
NucleoSpin <sup>®</sup> RNA II	Macherey-Nagel (Düren)
ECL plus Western Blotting Detektionssystem	Amersham Bioscience (Freiburg)
VenorGeM, Mycoplasma-Detektions Kit	Minerva Biolabs (Berlin)
Filme (Western Blotting)	Kodak (Stuttgart)
Affymetrix Arrays	Affymetrix (Santa Clara, CA, USA)
Kit RNA Nano Lab Chip <sup>TM</sup>	Agilent Technologies (Böblingen)
Celebrex (Wirkstoff Celecoxib)	Pfizer (Karlsruhe)
Cisplatin	Sigma (Deisenhofen)



### 2.1.2. Geräte

Gerät	Hersteller
Lamina Flow (Microflow)	Nunc™ (Wiesbaden)
CO <sub>2</sub> -Inkubatoren (Hera cell 150)	Heraeus (Hanau)
Zellkulturzentrifuge Universal R32	Hettich Zentrifugen (Tuttlingen)
Inverses Mikroskop (Axiovert 25)	Zeiss (Jena)
ABI Prism® 7300 Real Time PCR System	Applied Biosystems (Darmstadt)
PCR Block (Multi Cycler PTC)	Biozym (Oldendorf)
Microfuge Micro 200	Hettich Zentrifugen (Tuttlingen)
Schüttel-Thermoblock	Eppendorf (Hamburg)
pH-Meter (pH 210 Microprocessor pH Meter)	Hanna Instruments (Kehl am Rhein)
Photometer (Nanodrop® ND-1000 UV-VIS Spectrophotometer)	Peqlab Biotechnologie (Erlangen)
ELISA-Reader (Multiscan Ascent)	Thermo Electron Corporation (Dreieich)
PAA-Gelelektrophorese System	Biozym (Oldendorf)
Western Blot Apparatur (LKB Multiphor II)	Pharmacia/Pfizer Pharma (Karlsruhe)
Taumelschüttler (Biometra WT17)	Biometra (Göttingen)
Entwicklermaschine (Optimax Typ TR)	MS Laborgeräte (Heidelberg)
Agarosegelelektrophorese System	Keutz (Reiskirchen)
Geldokumentationssystem (Alpha Imager™)	Biozym (Oldendorf)
Agilent 2100 Bioanalyser	Agilent Technologies (Böblingen)
FACS Calibur™	BD Bioscience (Heidelberg)

### 2.1.3. Western Blot Antikörper

	Antigen	Produkt/Hersteller	Ig Klasse	Eingesetzte Verdünnung
1. AK	phosphoPaxillin [pY <sup>31</sup> ]	44-720G/Biosource	Kaninchen IgG	1:1000
	phosphoERK1/2 [pT <sup>185</sup> pY <sup>187</sup> ]	44-680G/Biosource	Kaninchen IgG	1:1000
	phosphoAKT/PKB [pS <sup>473</sup> ]	44-622G/Biosource	Kaninchen IgG	1:1000
	phosphoSrc [pY <sup>418</sup> ]	44-660G/Biosource	Kaninchen IgG	1:1000
	INSR (β-Untereinheit)	AHR0271/Biosource	Maus IgG	1:1000
	IGF-1Rβ	sc-713/Santa Cruz	Kaninchen IgG	1:200
	phosphoSTAT1 [Tyr <sup>701</sup> ]	#9171/CellSignalling	Kaninchen IgG	1:1000
	Aktin	Actin Ab-1/MP Biomedicals, USA	Maus IgG	1:10.000
2. AK	anti Kaninchen (HRP-gekoppelt)	#7074/Cell Signaling		1:2500
	anti Maus (HRP-gekoppelt)	#7076/Cell Signaling		1:2500

## 2.1.4. Oligonukleotide

### 2.1.4.1. Primer

Die Primer wurden sowohl von der Firma Thermo Electron Corporation (Ulm) wie auch von der Firma Metabion (Planegg-Martinsried) synthetisiert. Die Ausgangskonzentration betrug 100 µM, in den PCR-Reaktionen wurde eine 10 µM Arbeitsverdünnung eingesetzt. Wenn möglich, wurden die Primer für die Expressions-Analysen übergreifend auf zwei verschiedenen Exons gelegt, um eine Amplifikation eventuell enthaltener, kontaminierender genomischer DNA zu verhindern.

Primerpaare (Sequenz: 5' → 3') und ,gene bank accession no.‘		Position	Schmelz- temperatur	Gleichung der Standardkurve der qPCR mit Korrelationskoeffizient (R <sup>2</sup> )
<b>OAS 2</b>	NM_002535			
TCA AGG ATT TAC CCT CGC TG		781-800	60°C	nur für PCR, daher keine Standardkurve erforderlich
CTG GAT CCA AGA TTA CTG GC		1004-1023	60°C	
<b>IGF-II</b>	NM_000612			
GTG CTT CTC ACC TTC TTG GC		583-603	62°C	y = -3,88x + 18,45 R <sup>2</sup> =0,989
GTC TTG GGT GGG TAG AGC AA		1028-1048	62°C	
<b>18S-rRNA</b>	NM_022551			
AAA CGG CTA CCA CAT CCA AG		447-467	60°C	y = -3,82x + 20,61 R <sup>2</sup> =0,998
CCT CCA ATG GAT CCT CGT TA		582-602	58°C	
<b>INSR</b>	NM_000208			
ACT ACA GCG TGC GAA TCC G		2864-2883	60°C	y = -2,72x + 24,91 R <sup>2</sup> =0,978
TCC GGC ACG TAC ACA GAG C		3128-3146	62°C	
<b>IGF1R</b>	NM_000875			
AAG TTA TCT CCG GTC TCT GAG GC		3308-3331	70°C	y = -3,10x + 19,73 R <sup>2</sup> =0,995
TGA AAT CTT CGG CTA CCA TGC		3467-3487	64°C	
<b>IGF2R</b>	NM_000876			
ACA GCC CTG CGG TGA CTA TTA CAT		981-1004	72°C	y = -3,02x + 18,22 R <sup>2</sup> =0,998
CTG TGA GTT TGG GAA TGG TGC		1033-1053	64°C	
<b>TNFAIP 3</b>	NM_006290			
ACA GAA ACA TCC AGG CCA CC		275-295	62°C	y = -3,48x + 16,24 R <sup>2</sup> =0,993
GAA CGC CCC ACA TGT ACT GAG		392-413	66°C	
<b>VEGF</b>	NM_001033756			
CTT GCC TTG CTG CTC TAC C		735-754	60°C	y = -3,53x + 18,86 R <sup>2</sup> =0,996
CAC ACA GGA TGG CTT GAA G		917-936	58°C	
<b>IGFBP-2</b>	NM_000597			
CAG GTT GCA GAC AAT GGC GAT		527-547	64°C	y = -1,29x + 26,93 R <sup>2</sup> =0,981
GCT TCC GGC CAG CAC TG		616-632	58°C	
<b>TIMP 2</b>	NM_003255			
CCT CCT CGG CAG TGT GTG G		580-598	64°C	y = -2,17x + 25,69 R <sup>2</sup> =0,996
TGG GTG GTG CTC AGG GTG T		703-721	62°C	
<b>MAPK9</b>	NM_002752			
AGT CAT CCT GGG TAT GGG CTA C		636-657		y = -3,02x + 20,43 R <sup>2</sup> =0,998
TGA TGG TGT TCC CAG CTG CT		767-786	62°C	

#### 2.1.4.2. TaqMan Sonden

Die Sonden für die TaqMan-Analyse sind am 5' und am 3' Ende modifiziert. 5' tragen sie den Reporter-Fluoreszenzfarbstoff FAM (5,6-Carboxyfluoreszin), dessen Fluoreszenz (Absorptionsmaximum bei ca. 485 nm, Emissionsmaximum bei ca. 525 nm) durch die räumliche Nähe des ans 3' Ende gekoppelten ‚Quenchers‘ TAMRA (Tetramethyl-6-carboxyrhodamin) unterdrückt wird. Kommt es im Rahmen der DNA-Amplifikation zum Einbau der Sonde, wird durch die 5'→3' Exonuklease-Aktivität der verwendeten Polymerase der ‚Quencher‘ TAMRA abgespalten. Die Trennung der beiden Farbstoffe führt zum Anstieg des FAM-vermittelten Fluoreszenzsignals, welches sich proportional zur amplifizierten DNA-Menge verhält.

Sonde/ Gen Bank Accession Nr.	Position	Sequenz (5'→3')
IGF-II <i>Probe</i> NM_000612	997-1020	FAM-TTC AGG GAG GCC AAA CGT CAC CG-TAMRA
18S-rRNA <i>Probe</i> NM_022551	473-493	FAM-AGC AGG CGC GCA AAT TAC CC-TAMRA

#### 2.1.4.3. siRNA Sequenzen

Die verschiedenen siRNA-Sequenzen wurden unter Verwendung der Design-Tools der Firmen Qiagen ([www1.qiagen.com/Products/GeneSilencing/CustomSiRna/SiRnaDesigner](http://www1.qiagen.com/Products/GeneSilencing/CustomSiRna/SiRnaDesigner)) und Dharmacon ([www.dharmacon.com/sidesign/](http://www.dharmacon.com/sidesign/)) erstellt. Folgende Kriterien für die Auswahl der doppelsträngigen RNA wurden berücksichtigt:

- eine Länge von 19 nt
- ein GC-Gehalt von 30-52%
- höchstmögliche Genspezifität
- nicht mehr als drei aufeinander folgende gleiche Basen
- 3' zwei überhängende Thymidinbasen

Diese Kriterien beruhen auf den experimentell ermittelten Parametern von Reynolds (174).

Alle siRNAs mit Ausnahme der nonsense RNA (Qiagen, Hilden) wurden bei der Firma Eurogentec (Seraing, Belgien) bestellt.

Zielgen/ Gen Bank Accession Nr.	siRNA	Position	Sequenz
IGF-II/ NM_000612	IGF-II ds 1	898-916	5' uau gac acc ugg aag cag utt 3' 3' ttaua cug ugg acc uuc guc a5'
	IGF-II ds 2	790-808	5' cug gag acg uac ugu gcu att 3' 3' ttgac cuc ugc aug aca cga u5'
	IGF-II ds 3	1289-1307	5' gca cag cag cau cuu caa att 3' 3' ttuuu gaa gau gcu gcu gug c5'
INSR/ NM_000208	INSR ds 1	437-455 / $\alpha$ -Kette	5' gga uca cga cug uuc uuu att 3' 3' ttccu agu gcu gac aag aaa u5'
	INSR ds 2	2116-2134 / $\beta$ -Kette	5' guc gga uua uug ccu caa att 3' 3' ttcag ccu aa uac gga guu u 5'
	INSR ds 3	3598-3616 / $\beta$ -Kette	5' cug cau ggu cgc cca uga utt 3' 3' ttgac gua cca gcg ggu acu a 5'
IGF1R/ NM_000875	IGF1R ds 1	1766-1784 / $\alpha$ -Kette	5' gga cuc agu acg ccg uuu att 3' 3' ttccu gag uca ugc ggc aaa u 5'
	IGF1R ds 2	2259-2277 / $\alpha/\beta$ -Kette	5' gcg gag aga ugu cau gca att 3' 3' ttcgc cuc ucu aca gua cgu u 5'
	IGF1R ds 3	3329-3347 / $\beta$ -Kette	5' ggc cag aaa ugg aga aua att 3' 3' ttccg guc uuu acc ucu uau u 5'
Nonsilencing RNA	Nonsense	---	5' uuc ucc gaa cgu guc acg utt 3' 3' ttaag agg cuu gca cag ugc a 5'

### 2.1.5. Zellkulturmedien, Lösungen und Zellkulturzusätze

Wenn nicht anders angegeben, wurden die hier aufgeführten Produkte alle von der Firma PAA (Cölbe) bezogen.

Produkt	Inhaltsstoffe, Verwendung
DMEM, Dulbecco's modified Eagle's Medium mit L-Glutamin	Glukose (4,5 g/l), mit L-Glutamin, Kultivierung der Huh-7-Zellen
MEM, Modified Eagle's Medium mit $\text{Na}_2(\text{CO}_3)_2$	mit Earle's Salt und L-Glutamin, Kultivierung der Hep3B-Zellen
FCS, Fötales Kälberserum	Zusatzstoff für Zellkulturmedien
Penicillin-Streptomycin-Antibiotika-Lösung	10.000 U/ml Penicillin und 10 mg/ml Streptomycin, als antibakterieller Zusatz zum Kulturmedium
Trypsin-EDTA-Lösung	0,5 g/l Trypsin und 0,2 g/l EDTA, zum Ablösen und Passagieren der Zellen
OptiMEM (Gibco)	Medium für die siRNA Transfektion
Oligofectamin (Invitrogen)	Kationischer Carrier zum Transfizieren der siRNA
DMSO (AppliChem)	Zusatz zur Kryokonservierung der Zelllinien und Lösungsmittel für Medikamentenapplikation

### **2.1.6. Zelllinien**

Bei den verwendeten Zelllinien handelt es sich um immortalisierte Linien, die aus Zellen hepatozellulärer Karzinome etabliert wurden.

Die Zelllinie Huh-7 entstammt aus dem Tumor eines 57 Jahre alten männlichen Japaners und wurde von der *Japanese Collection of Research Bioresources* bezogen (Artikelnummer JCRB0403).

Die Zelllinie Hep3B wurde aus dem Tumorgewebe eines HBV-positiven Jungen afrikanischer Abstammung generiert. Diese Zelllinie trägt Teilintegrate des HBV-Genoms, ist allerdings nicht in der Lage, infektiöse Viruspartikel zu bilden. Die Zellen wurden von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) bezogen (Artikelnummer ACC93).

## **2.2. Methoden**

### **2.2.1. Zellkultur**

Bei den verwendeten Zelllinien Huh-7 und Hep3B handelt es sich um adhärent wachsende Zellen, die in Petrischalen oder Mehrlochplatten kultiviert wurden. Die Zellen wurden stets bei 37°C und einem CO<sub>2</sub>-Gehalt von 5% bei gesättigter Luftfeuchtigkeit inkubiert. Sofern nicht anders erwähnt, wurden die Zellen in ihrem entsprechenden Medium (siehe 2.1.5) unter Zusatz von 10% FCS und 1% Penicillin/Streptomycin Lösung kultiviert.

#### **2.2.1.1. Passagieren der Zellen**

Wenn die Zellen eine Konfluenz von ca. 90% erreicht hatten, wurden diese passagiert.

Zum Ablösen der Zellen wurde der Kulturüberstand vollständig entfernt und die Zellen mit der Trypsin/EDTA Lösung überschichtet. Während der Chelatbildner EDTA Mg<sup>2+</sup>-Ionen, die Bestandteil der Zellverbindung zum Untergrund sind, aus der Membran herauslöst und komplexiert, führte das Trypsin durch enzymatische Aktivität zum Ablösen der Zelle. Die mit Trypsin bedeckten Zellen wurden für 5-10 min im Brutschrank inkubiert, anschließend in ein Falcontube mit dem gleichen Volumen des entsprechenden Mediums überführt und für 10 min bei 800 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet im Medium resuspendiert. Dann wurde ein Aliquot (beim einfachen Passagieren etwa 1/4 bis 1/6) der Zellsuspension in ein frisches Kulturgefäß mit neuem Medium überführt und weiterhin im Brutschrank inkubiert.

#### **2.2.1.2. Kryokonservierung und Auftauen der Zellen**

Für die Kryokonservierung wurde das nach der Zentrifugation erhaltene Pellet (siehe 2.2.1.1) einer zu 90% konfluenten 10 cm Zellkulturplatte in 1,8 ml des entsprechenden Kulturmediums, welches mit 10% DMSO versetzt war, resuspendiert, in ein Kryovial (Greiner) überführt und sofort eisgekühlt. Diese Zellsuspension wurde langsam bis zu -70°C eingefroren (Abkühlung um ca. 10°C pro Stunde) und dann in flüssigem Stickstoff gelagert.

Um die kryokonservierten Zellen wieder in Kultur zu nehmen, wurde ein Kryoröhrchen aus dem flüssigen Stickstoff entnommen und zügig auf 37°C erwärmt. Die Zellsuspension wurde in 10 ml vorgewärmtes Medium überführt, um möglichst schnell das zytotoxische DMSO zu verdünnen. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (1000 rpm, 5 min) pelletiert, der Überstand verworfen und die Zellen wie beschrieben kultiviert (siehe 2.2.1.1).

#### **2.2.1.3. Zellzahlbestimmung**

Für die Experimente war das Aussähen einer genau definierten Zellzahl von großer Bedeutung. Hierfür wurden von der Zellsuspension (siehe 2.2.1.1) 10 µl in eine Neubauer Zählkammer pipettiert. Der Mittelwert der gezählten Zellen in den vier Eckquadraten multipliziert mit dem Faktor  $10^4$  entspricht der Zellzahl in einem Milliliter der Suspension.

$$\text{Zellzahl} = (\Sigma \text{Zellzahl der Eckquadrate}) / 4 * 10^4$$

#### **2.2.1.4. Kontaminationsprüfung**

Kontaminationen durch Bakterien und Pilze wurden lichtmikroskopisch überprüft. Zur Testung auf Mycoplasmen wurden die Zellen alle drei Monate unter Verwendung des Mycoplasma-Detektionskits VenorGeM (Minerva Biolabs) auf eine Kontamination hin überprüft. Das Verfahren basiert auf der Untersuchung des Kulturüberstand auf Mycoplasmen-DNA mittels PCR (siehe 2.2.2.6). Bei der Durchführung des Tests wurden genau die Vorgaben des Herstellers befolgt, als Polymerase wurde die Taq-Polymerase der Firma SIGMA verwendet. Der Test wird als Multiplex-PCR durchgeführt. Bei einer Kontamination wird ein 265-287 bp großes PCR-Produkt erhalten. Zur Überprüfung der PCR wird zusätzlich eine vom Hersteller gelieferte interne Kontrolle eingesetzt, die ein 191 bp Amplifikat ergibt. Als Positivkontrolle dient die im Kit enthaltene Mycoplasmen-DNA, die eine Bande bei 278 bp ergibt. Alle getesteten Zellen waren negativ.

#### **2.2.1.5. siRNA Transfektion**

Das Einbringen der siRNA erfolgte mit Hilfe des kationischen Karriers Oligofectamin (Invitrogen). Durch das Anlagern der Kationen an die RNA verliert diese ihren hydrophoben Charakter und kann durch die Zellmembran diffundieren.

Je nach Zellbedarf für die nachfolgenden Analysen erfolgte die Transfektion im 6-Well Maßstab (RNA-Isolierung 2.2.2.2, Vitalitätstest 2.2.4.1 und Proliferationstest 2.2.4.2) oder im 6 cm Maßstab (FACS-Analyse 2.2.4.3, Proteinisolierung 2.2.3.1). Da die Fläche einer 6 cm Platte der zweifachen Fläche eines Wells einer 6-Well Platte entspricht, wurden die einzelnen Komponenten bei der Transfektion in 6 cm Platten entsprechend verdoppelt.

Für die Transfektion im 6-Well Maßstab wurden  $1,5 \times 10^5$  Zellen je Well ausgesät. Die Inkubation der Zellen erfolgte ab diesem Zeitpunkt ohne die Zugabe von Antibiotika. Am nächsten Tag wurde dann die siRNA nach dem optimierten Transfektionsprotokoll in die Zellen eingebracht.

Es wurde in jedes Well 2 ml frisches Kulturmedium mit 10% FCS ohne Antibiotika vorgelegt. 55 µl OptiMEM wurden mit 5 µl Oligofectamin (Lösung A) und 12 µl einer 20 µM siRNA mit 200 µl OptiMEM (Lösung B) für 10 min bei RT inkubiert. Nach dem Mischen von Lösung A und Lösung B erfolgte eine weitere 20 minütige Inkubation bei RT. Die Transfektionslösungen wurden auf ein Volumen von 400 µl mit OptiMEM aufgefüllt (128 µl bei einer siRNA Transfektion, 340 µl bei einer Oligofectamin Kontrolle und 400 µl bei unbehandelten Kontrollzellen) und in den Kulturüberstand getropft. Durch vorsichtiges Schwenken der Platten wurde eine gleichmäßige Verteilung der Transfektionslösung erzielt und die Platten wurden über Nacht im CO<sub>2</sub>-Inkubator kultiviert. Am nächsten Morgen erfolgte ein vollständiger Medienwechsel bei allen Proben.

#### Pipettierschema für die siRNA Transfektion

Arte der Probe		siRNA-behandelte Zellen	Oligofectamin Kontrolle	Unbehandelte Kontrollzellen
Lsg. A	OptiMEM	55 µl	55 µl	--
	Oligofectamin	5 µl	5 µl	--
Lsg. B	OptiMEM	200 µl	--	--
	siRNA [20 µM]	12 µl	--	--
Lösung A und Lösung B 10 min bei RT inkubieren				
Lösung A und Lösung B mischen und erneut 20 min bei RT inkubieren				
Lsg. A+B	OptiMem	128 µl	340 µl	400 µl
Transfektionsgemisch auf die Zellen pipettieren				

#### 2.2.1.6. Behandlung der Zellen mit Chemotherapeutika

Die Zellen wurden mit Cisplatin und Celecoxib behandelt. Cisplatin (*cis*-Diammineplatinum(II)dichloride, Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) ist ein Chemotherapeutikum welches u.a. in

der Therapie hepatozellulärer Karzinome eingesetzt wird. Es wurde in einer Konzentration von 10 mg/ml in N,N-Dimethylformamid (DMF) gelöst und entsprechend der gewünschten Konzentration mit Medium verdünnt und auf die Zellen gegeben.

Celecoxib (4[5-(methylphenyl)-3-(trifluoromethyl)-1-H-pyrazol-1yl],  $C_{17}H_{14}F_3N_3O_2S$ ) wurde durch Lösen einer Kapsel des Medikaments Celebrex (Pfizer, Karlsruhe) in Dimethylsulfoxid (DMSO) als 50 mM Stammlösung erhalten und in entsprechender Verdünnung mit Medium in den Versuch eingesetzt.

## 2.2.2. Nukleinsäuretechniken

### 2.2.2.1. siRNA Annealing

Die siRNAs wurden als lyophilisierte einzelsträngige *sense* und *antisense* RNA-Moleküle geliefert. Die Lyophilisate wurden zu einem 100  $\mu$ M Stock resuspendiert, aliquotiert und bei  $-70^{\circ}\text{C}$  gelagert. Bevor sie für die Experimente eingesetzt werden konnten, mussten die Einzelstränge zu der inhibierenden dsRNA zusammengefügt (*annealed*) werden. Hierfür wurden je ein 100  $\mu$ l Aliquot *sense* und *antisense* RNA mit 50  $\mu$ l 5x Annealing-Buffer gemischt und für 2 min im Thermoblock auf  $96^{\circ}\text{C}$  erhitzt. Anschließend wurde der Block ausgeschaltet und die Lösung kühlte im Thermoblock über 1 Std. auf ca.  $37^{\circ}\text{C}$  herunter. Bei diesem Abkühlungsprozeß kommt es zur Anlagerung der komplementären Sequenzen und es bildet sich eine doppelsträngige siRNA. Diese kann für einige Wochen bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert werden.

5x Annealing-Buffer	
Tris HCl, pH 7,5-8	250 mM
NaCl	500 mM

### 2.2.2.2. Isolierung der Gesamt-RNA aus Zellen

Die Gesamt-RNA wurde mittels des NucleoSpin<sup>®</sup> RNA II Kits isoliert. Die Methode basiert auf einer Säulenaffinitätschromatographie und die Angaben des Herstellers wurden genau befolgt. Die Elution erfolgte mit 30  $\mu$ l RNase-freiem  $\text{H}_2\text{O}$ , welches bei der Konzentrationsbestimmung als Referenzwert (siehe 2.2.2.3) eingesetzt wurde.

### 2.2.2.3. Konzentrationsbestimmung der RNA

Die Quantifizierung der RNA erfolgte durch eine Messung des Absorptionsspektrums im Nanodrop Photometer. Der Elutionspuffer, RNase-freies  $\text{H}_2\text{O}$ , wurde als Referenzwert genutzt, die Konzentration errechnet sich durch folgende Formel:

$$c [\mu\text{g}/\mu\text{l}] = \text{OD}_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times F$$

(der Multiplikationsfaktor „F“ für RNA beträgt 40  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )



Als Maß für die Reinheit dient der Quotient  $\text{Abs.}_{260 \text{ nm}}/\text{Abs.}_{280 \text{ nm}}$ , die RNA hat eine gute Qualität, wenn der Quotient  $> 1,8$  ist. Bei Analysen, für die die Integrität der RNA von zentraler Bedeutung war, wie die Array-Analysen, wurde die Qualität der RNA zusätzlich auf einem AGILENT-Chip (RNA Nano Lab Chip<sup>TM</sup>, Agilent Technologies überprüft. Bei dieser auf dem Prinzip der Gelelektrophorese basierenden Chipanalyse wird mittels eines speziellen Algorithmus die Qualität der RNA in Form der RNA Integrity Number (RIN) angegeben. Anhand der RIN, die das relative Maß an Degradation angibt (von RIN=1 (stark degradiert, schlechte Qualität) bis zu RIN=10 (nicht degradiert, sehr gute Qualität)) kann die Qualität verschiedener Proben verglichen und eine Eignung der RNA für verschiedene Experimente abgeschätzt werden. Für Array-Analysen wurden nur Proben mit einer RIN $>9$  eingesetzt.

#### 2.2.2.4. Reverse Transkription (cDNA Synthese)

Für die reverse Transkription wurden 1,5 µg der Gesamt-RNA zusammen mit 2 µl dNTPs [0,8 mM] und 1 µl eines Random-Hexamer-Primers [200 ng/µl] für 5 min auf 70°C erhitzt, um die Sekundärstruktur der RNA zu denaturieren. Nach der Zugabe von 4 µl 5x Reaktionspuffer erfolgte eine 5minütige Inkubation bei 25°C um die Anlagerung der Primer an die RNA zu ermöglichen. Es folgte die Zugabe von 1 µl reverser Transkriptase RevertAid<sup>TM</sup> H Minus MuLV [1 U/µl] und nach weiteren 10 min bei 25°C wurde für eine Stunde bei 42°C die cDNA synthetisiert. Das abschließende Erhitzen für 10 min auf 70°C diente der Inaktivierung der Polymerase.

Die so generierte cDNA wurde als Template für die PCR (2.2.2.6) und die semiquantitative ‚*realtime*‘ PCR (2.2.2.5) eingesetzt.

1. Schritt	2. Schritt	3. Schritt
1,5 µg RNA+ 2 µl NTPs + 1 µl Randomprimer  → 5 min / 70°C	+ 4 µl M-Mul V Puffer  → 5 min / 25°C	+ 1 µl Reverse Transkriptase  → 10min / 25°C → 60min / 42°C → 10min / 70°C

#### 2.2.2.5. Semiquantitative ‚*realtime*‘ PCR

Die Amplifikationsreaktion unter Verwendung der TaqMan<sup>®</sup>-PCR Technologie im ABI Prism<sup>®</sup> 7300 dient zur gezielten Expressionsanalyse einzelner Gene. Es wurde überprüft, in welchem Maße durch die genspezifische RNA*interference* eine Reduktion der mRNA Expression erzielt werden konnte. Die Amplifikation eines so genannten *housekeeping genes*,

von dem bekannt ist, dass es keiner maßgeblichen Regulation durch das Experiment unterliegt, in diesem Falle der 18S RNA, wurde als endogene Kontrolle (endogK) verwendet. Die Amplifikationsrate wurde anhand der Fluoreszenzintensität der einzelnen PCR Proben bestimmt. Hierbei gibt es zwei unterschiedliche Systeme. Für die Analyse der IGF-II Expression wurde ein Sonden basierender TaqMan<sup>®</sup> durchgeführt. Zusätzlich zu den anderen Komponenten wird dem Reaktionsansatz eine genspezifische Sonde zugefügt, die mit einem Reporterfarbstoff FAM und einem Quencherfarbstoff TAMRA markiert ist (2.1.4.2). Durch den Einbau der Sonde steigt das Fluoreszenzsignal proportional zur amplifizierten DNA-Menge. Die andere Möglichkeit ein Fluoreszenzsignal zu erzeugen, wird durch die Zugabe von SYBR<sup>®</sup>Green in den Reaktionsansatz erreicht. Dabei handelt es sich um einen Farbstoff, der nur nach Interkalation in doppelsträngige DNA fluoresziert. Da hier im Vergleich zum sondenbasierenden TaqMan das Signal auch bei Generierung unspezifischer Produkte steigt, ist die Auswahl hochspezifischer Primer von zentraler Bedeutung. Um die Spezifität überprüfen zu können, wird im Anschluss an die Amplifikations-PCR eine Schmelzkurvenanalyse (Parameter siehe folgende Seite) durchgeführt. Durch Denaturierung und langsame Abkühlung des PCR-Produktes kommt es zur SYBR<sup>®</sup>Green Interkalation und damit zur Fluoreszenzzunahme in Abhängigkeit der Schmelztemperatur der verschiedenen PCR-Produkte. Ein einzelner, schmaler Fluoreszenzpeak weist auf ein spezifisches Produkt hin.

Für alle Primerpaare wurde anhand einer logarithmischen Verdünnungsreihe (1:10, 1:100, 1:1.000, 1:10.000) eine Standardkurve mit Korrelationskoeffizienten generiert, deren Steigung Auskunft über die Effizienz der PCR-Reaktion gibt. Die Standardkurve wurde zur Berechnung der Expressionswerte herangezogen. Die Expressionsdaten eines jeden Genes wurden für jede Probe als Dreifachbestimmung (Triplett) erhoben. Als Messwert wird die Anzahl der Amplifikationszyklen, die zum Erreichen einer bestimmten Fluoreszenzintensität (Schwellenwert) erforderlich sind, genommen ( $C_T$ -Wert).

Zur Auswertung wurden zunächst anhand der Gleichung der entsprechenden Standardkurve die Mittelwerte (MW) und die Standardabweichungen (STABW) der Triplett- $C_T$ -Werte in durchschnittliche relative Mengeneinheiten ( $^{MW}Gen$  bzw.  $^{MW}endogK$  und  $^{STABW}Gen$  bzw.  $^{STABW}endogK$ ) umgerechnet. Die durchschnittliche relative Mengeneinheit einer Genexpression wurde gegen die entsprechende durchschnittliche relative Mengeneinheit der endogenen Kontrolle für jede Behandlung X normalisiert. Die Berechnung und die Fortpflanzung der Standardabweichung erfolgt unter Berücksichtigung gültiger statistischer Verfahren (175).

$$\text{normalisierte } {}^{\text{MW}}\text{Gen}_X = \frac{{}^{\text{MW}}\text{Gen}_X}{{}^{\text{MW}}\text{endogK}_X}$$

$$\text{STABW} = \sqrt{\left(\frac{{}^{\text{STABW}}\text{Gen}_X}{{}^{\text{MW}}\text{Gen}_X}\right)^2 + \left(\frac{{}^{\text{STABW}}\text{endogK}_X}{{}^{\text{MW}}\text{endogK}_X}\right)^2} \times \frac{{}^{\text{MW}}\text{Gen}_X}{{}^{\text{MW}}\text{endogK}_X}$$

Die so gewonnene normalisierte Expression eines Gens unter definierten Versuchsbedingungen wurde dann in Relation zu der normalisierten Expression des Gens in unbehandelten Zellen (Kalibrator) gesetzt. So erhält man die relative mRNA-Expression eines Gens nach der Behandlung X im Verhältnis zum Referenzwert der mRNA-Expression unter Kontrollbedingungen R.

$$\text{rel. mRNA Expression}_X = \frac{{}^{\text{MW}}\text{Gen}_X}{{}^{\text{MW}}\text{endogK}_X} \times \frac{{}^{\text{MW}}\text{endogK}_R}{{}^{\text{MW}}\text{Gen}_R}$$

$$\text{STABW} = \sqrt{\left(\frac{{}^{\text{STABW}}\text{Gen}_X}{{}^{\text{MW}}\text{Gen}_X}\right)^2 + \left(\frac{{}^{\text{STABW}}\text{endogK}_X}{{}^{\text{MW}}\text{endogK}_X}\right)^2} \times \frac{{}^{\text{MW}}\text{Gen}_X}{{}^{\text{MW}}\text{endogK}_X} \times \frac{{}^{\text{MW}}\text{endogK}_R}{{}^{\text{MW}}\text{Gen}_R}$$

Pipettierschema (25µl Ansatz)

Mastermix (2x)	50% [v/v]
je Primer	300 nM
cDNA („template“)*	$\frac{1}{5}$ des Ansatzes
- Zielgene	1:25
- endogene Kontrollen	1:5000

qPCR Programm

50°C 2 min
95°C 15 min
95°C 15 sec
60°C 1 min

} 40x

Schmelzkurvenanalyse

95°C	15 sec
60°C	30 sec
95°C	15 sec

\*Die cDNA wurde für die Amplifikation von Zielgenen 1:25 und für die Amplifikation der endogenen Kontrollen 1:5.000 verdünnt, um durch das größere Volumen systematische Pipettierfehler und Ungenauigkeiten zu minimieren.

#### 2.2.2.6. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Um die Induktion einer unspezifischen Interferonantwort ausschließen zu können, wurde die Transkription des Interferon-Zielgens OAS 2 (2'-5' Oligoadenylate Synthetase 2) in der PCR überprüft. Hierfür wurde 1 µl der 1:10 verdünnten cDNA als Template in die PCR eingesetzt. Als Positivkontrolle diente die cDNA Interferon-γ behandelter Huh-7-Zellen sowie

RNA/cDNA, die aus HCCs gewonnenen wurde, in denen IFN induzierte Gene nachweislich verstärkt expremiert werden.

Die PCR Produkte wurden mit Ladepuffer versetzt und in einem 2%igen Agarosegel (2 g Agarose, 100 ml TAE-Laufpuffer und 3 µl Ethidiumbromid) elektrophoretisch aufgetrennt (120 V, 20 min) und anschließend digital dokumentiert.

#### Ansatz OAS 2-PCR

Template (cDNA 1:10)	Je Primer [10 µM]	dNTPs [10 mM]	10x Reaktionspuffer	MgCl <sub>2</sub> [25 mM]	Taq-Polymerase [5 U/µl]	H <sub>2</sub> O	Σ
1 µl	3 µl	1 µl	5 µl	3 µl	0,2 µl	33,8 µl	50 µl

#### PCR-Programm

Schritt	Temperatur	Zeit
1.	95°C	3 min
2.	95°C	50 sec
3.	58°C	70 sec
4.	72°C	40 sec
35 Zyklen Schritt 2.-4.		
5.	72°C	5 min

#### 50x TAE Puffer

TrisHCl	2 M
Eisessig	0,0571% [v/v]
EDTA (pH 8,0)	50 mM
TAE Laufpuffer 50x TAE 1:50 mit H <sub>2</sub> O verdünnt	

#### Ladepuffer

Bromphenolblau	0,42% [w/v]
Xylen Cyanol FF	0,42% [w/v]
Glycerin	55,4% [v/v]
Mit dest. H <sub>2</sub> O auf 100% auffüllen	

### 2.2.3. Protein-Analytik

#### 2.2.3.1. Isolierung zellulärer Gesamtproteinextrakte

Für die Proteinisolierung einer ca. 80% konfluenten Zellkulturschale wurde der Überstand vollständig entfernt und die Zellen 2x mit PBS gespült. Dann wurden die Zellen mit Proteinisolierungspuffer bedeckt (400 µl für eine 10 cm Schale) und 5 min lang auf Eis inkubiert. Das Zelllysate wurde mit einem „Zellschaber“ von der Platte abgekratzt, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und sofort auf Eis gestellt. Um eine vollständige Lyse der Zellen zu gewährleisten, wurden die Isolate 2x 45 sec sonifiziert, zwischen den Intervallen erfolgte eine einminütige Eiskühlung. Anschließend wurden die Zelltrümmer durch eine

10 min Zentrifugation bei 4°C und 13.000 rpm pelletiert und der Überstand in ein frisches Eppendorfgefäß überführt. Die Proteinextrakte wurden bei -20°C gelagert.

#### Proteinisolierungspuffer

10x cell lysis buffer (Cell Signaling)	100 µl
Proteinase Inhibitorcocktail (SIGMA)	20 µl
Reinstwasser	880 µl

#### 2.2.3.2. Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration wurde durch die Messung der Absorption bei 280 nm im NanoDrop® ND-1000 UV-VIS Spectrophotometer bestimmt. Bei der Wellenlänge 280 nm liegt, basierend auf der Absorption der aromatischen Reste, das Absorptionmaximum für Proteine, daher kann durch Bestimmung dieses Wertes auf die Proteinkonzentration rückgeschlossen werden.

#### 2.2.3.3. Western Immunoblot

Die gelelektrophoretische Auftrennung (SDS-PAGE) der Gesamt-Proteinextrakte erfolgte je nach Größe des zu detektierenden Proteins in einem 8% oder 12%igen Polyacrylamidgel bestehend aus Trenn- und Sammelgel (52 cm<sup>2</sup>, bei 50 mA für 15 min und bei 100 mA für 1-2 Std.). Anschließend wurden die Proteine auf eine für 1 min mit Methanol vorbehandelte PVDF Membran transferiert (bei 1 mA/cm<sup>2</sup> für 90 min). Zum Blockieren der unspezifischen Bindungsmöglichkeiten erfolgte eine Inkubation in 1x TBST mit 5% Milchpulver für 1 Std. bei Raumtemperatur auf einem Taumelschüttler, anschließend wurde der entsprechende Erstantikörper hinzugefügt und die Membran unter ständiger Bewegung ü.N. bei 4°C inkubiert. Die Membran wurde 3x für je 10 min in 1x TBST und anschließend für 1 Std. mit dem entsprechenden Zweitantikörper in 1x TBST mit 5% Milchpulver bei Raumtemperatur auf einem Taumelschüttler geschwenkt. Nach drei weiteren Waschschritten mit 1x TBST erfolgte die Signaldetektion mit dem ‚ECL plus Western Blotting Detektionssystem‘ nach Herstellerangaben. Die Belichtung der Kodak® Filme war abhängig von der Signalstärke (0,5-10 min); die Entwicklung der Filme wurde automatisch (Optimax) durchgeführt.

Für den Nachweis der Aktin-Expression als Ladekontrolle wurde die Inkubation mit dem Erstantikörper für nur 1 Std. bei Raumtemperatur durchgeführt. Außerdem erfolgte die Signaldetektion mit der selbst angesetzten Signaldetektionslösung AB (2 minütige Inkubation bei Raumtemperatur), die weniger sensitiv ist. Da das Aktinsignal meistens sehr stark war, wurden die Filme sehr kurz belichtet (5 bis 20 Sekunden) und anschließend automatisch entwickelt.

**Acrylamidgel:**

	<b>Trenngel [8%]</b> Proteine > 80 kD	<b>Trenngel [12%]</b> Proteine < 80kD	<b>Sammelgel</b>
Acrylamid-Mix	8,1% [v/v]	12% [v/v]	5% [v/v]
Tris-HCl	375 mM (pH 8,8)	375 mM (pH 8,8)	127 mM (pH 6,8)
SDS („sodium dodecyl sulfate“)	0,1% [w/v]	0,1% [w/v]	0,1% [w/v]
Ammonium Persulfat (APS)	0,1% [v/v]	0,1% [v/v]	0,1% [v/v]
TEMED	0,04% [v/v]	0,06% [v/v]	0,1% [v/v]

<b>Laufpuffer</b> (Gelelektrophorese)	
Glycin	387 mM
TrisHCl	50 mM
SDS	0,2% [w/v]

<b>Transferpuffer</b> (Blotten)	
Glycin	194 mM
TrisHCl	25 mM
Methanol	20%

<b>TBS (10x, pH 7,6)</b>	
TrisHCl	200 mM
NaCl	1,5 M

<b>TBST (1x)</b>	
TBS (10x)	10% [v/v]
Tween	0,1% [v/v]

**SignaldetektionslösungAB**

<b>Lösung A</b>		<b>Lösung B</b>	
TrisHCl (pH 8,0)	98,5 mM	TrisHCl (pH 8,0)	99,4 mM
Coumarsäure	0,39 mM	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0,018% [v/v]
Luminol	2,46 mM		

**2.2.3.4. Densitometrische Auswertung der Proteinbanden**

Die Auswertung erfolgte mit dem Analyse Programm „DensoSpot“ der Alphamager Software. Hierbei werden zunächst Rechtecke gleicher Größe um die zu quantifizierenden Banden gelegt. Ein weiteres Rechteck gleicher Größe, das in einem repräsentativen Bereichs des Hintergrunds platziert wird, dient zusammen mit der Bande der Kontrolle als Referenzpunkt. Das ‚Hintergrundrechteck‘ wird als 0% bzw. Signalstärke 0, das ‚Kontrollrechteck‘ als 100% bzw. Signalstärke 1 definiert. Die Signalintensität der anderen Banden wird jetzt im Verhältnis zu diesen beiden Werten ausgewertet.

Um eventuelle Abweichungen der Auftragsmenge zu berücksichtigen, wurde diese Analyse sowohl mit den Western Blots der Zielproteine (Signalintensität<sub>Zielprotein</sub>) wie auch mit den Western Blots der jeweiligen Aktin Ladekontrolle (Signalintensität<sub>Aktinkontrolle</sub>) durchgeführt. Die relative Signalstärke des Zielproteins errechnet sich aus dem Quotienten der Zielproteinsignalstärke und der Aktinkontrollensignalstärke.

$$\text{Relative Signalstärke des Zielproteins} = \frac{\text{Signalintensität}_{\text{Zielprotein}}}{\text{Signalintensität}_{\text{Aktinkontrolle}}}$$

## **2.2.4. Funktionelle Analysen**

### **2.2.4.1. Zellvitalitätstest (MTT-Test)**

Die Bestimmung der Zellvitalität beruht auf der Fähigkeit einer biologisch aktiven Zelle, ein Chromophor (modifiziertes Tetrazoliumsalz) zu reduzieren. Die chemische Reduktion des Chromophors kann kolorimetrisch bestimmt werden und dient als Maß für die relative Anzahl vitaler Zellen.

Zur Bestimmung der Zellvitalität wurde am Tag nach der Inhibierung die Zellzahl jeder Probe bestimmt und es wurden jeweils 2000 und 4000 Zellen in 48-Well Platten ausgesät. Nach vier (4000 Zellen) und sechs Tagen (2000 Zellen) wurde der MTT-Test wie vom Hersteller angegeben durchgeführt. Die Messung des Farbumschlags erfolgte bei 450 nm (Referenzwellenlänge 630 nm) im ELISA Reader Multiscan Ascent. Für die Auswertung wurde prozentual die relative Zellvitalität im Vergleich zu den Kontrollzellen bestimmt.

### **2.2.4.2. Proliferationstest (BrdU-ELISA)**

Für die Bestimmung der Proliferationsrate wurden die Zellen an Tag 2 nach der Inhibierung gezählt und 1000 bzw. 3000 Zellen auf einer 96-Well Platte ausgesät. Am nächsten Tag wurden die Zellen je nach Konfluenz für 2- 4 Stunden in Medium mit 10  $\mu$ M BrdU inkubiert. Die proliferierenden Zellen bauen anstelle des Thymidins das Brom markierte Basenanalogen dUracil ein und können so durch eine Enzym-gekoppelte Färbung und den dadurch bewirkten Farbumschlag messbar gemacht werden. Die Angaben der Herstellers Amersham wurden genau befolgt, die Messung erfolgte bei 450 nm (Referenzwellenlänge 630 nm) im ELISA Reader Multiscan Ascent. Wie auch beim MTT-Test wurde die relative Proliferationsrate prozentual im Vergleich zu den Kontrollzellen bestimmt.

### **2.2.4.3. FACS-Analyse**

Zur Bestimmung der Apoptoserate und der genauen Analyse des Zellzyklusses wurden die Zellen in der FACS Analyse untersucht. Von den einzelnen Proben wurden immer Triplets zur Untersuchung eingesetzt.

Nach der jeweiligen Behandlung wurden die Zellen trypsiniert und zusammen mit dem Zellkulturüberstand zentrifugiert (10 min bei 800 rpm). Das Zellpellet wurde in 1 ml PBS resuspendiert, 200  $\mu$ l der Zellsuspension mit 500  $\mu$ l Nicoletti-Puffer gemischt, und so mit Propidiumiodid (PI), einem DNA-interkalierenden Farbstoff, gefärbt. Im FACS-Calibur wurden jeweils 10.000 Zellen pro Probe hinsichtlich ihrer Größe, Granularität und Fluoreszenzintensität gemessen. Da die Interkalation aus sterischen Gründen nicht beliebig häufig sondern nur mit gewissen Basenpaaren Zwischenraum erfolgen kann, führt die

Degradation der DNA zu einer erhöhten Interkalationshäufigkeit. Somit dient die Fluoreszenzintensität nicht nur als Marker für die DNA-Menge sondern auch für den Degradationszustand der DNA. Die Menge der DNA gibt Aufschluss über die Zellzyklusphase der jeweiligen Zelle, das Ausmaß der Degradation ermöglicht Rückschlüsse auf frühe, mittlere und späte Apoptose. Je geringer die Fluoreszenz, desto degradiert die DNA und umso weiter fortgeschritten ist die Apoptose.

Die Auswertung für die Apoptoseanalyse erfolgt durch eine logarithmische Auftragung der Zellzahl gegen die Fluoreszenzintensität im Acquisitionsprogramm CellQuest Pro<sup>TM</sup> (BD-Bioscience), für die Analyse des Zellzyklus erfolgt die Auswertung mit dem Programm ModFit LT<sup>TM</sup> (Verity Software House Inc.), die Auftragung der graphischen Darstellung erfolgt linear. In den zur Auswertung erstellten Histogrammen wird die Größe der DNA-Fragmente (X-Achse) gegen die Anzahl der Zellen (Y-Achse) aufgetragen. Während lebende Zellen einen charakteristischen G0/G1 und G2/M Peak zeigen, ist die kürzere, fragmentierte DNA der apoptotischen Zellen links neben dem Peak der G0/G1 Phase in den ersten drei Dekaden der logarithmischen Darstellung zu sehen. Dabei befinden sich in der dritten Dekade Zellen in der frühen Apoptose, in der zweiten Dekade Zellen mittlerer Apoptose und in der ersten Dekade die Zellen in der späten Apoptose bzw. in nekrotischem Zustand.

Nicolettipuffer	
Propidium-Iodid	50 mg/ml
Natrium-Citrat	0,1% [w/v]l
Triton X-100	0,1% [v/v]l

### 2.2.5. GeneChip<sup>®</sup> Expression Arrays

Die ‚GeneChip<sup>®</sup> Expression Arrays‘ wurden in enger Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Gretz (Zentrum für Medizinische Forschung (ZMF), Uniklinik Mannheim) durchgeführt.

Die verwendeten ‚Human Genome U133A 2.0 Arrays‘ (Affymetrix) repräsentieren über 14.500 Gene des humanen Genoms, wobei jedes Gen durch 11-20 Oligonukleotidabschnitte (Proben) mit einer jeweiligen Länge von 25 bp repräsentiert wird (= ein Probensatz). Aufgrund der fortlaufenden Aktualisierung der Genom- und Transkriptom-Datenbanken werden auch die Zuordnungen der auf dem Array vorhandenen Sequenzen regelmäßig aktualisiert. Neuere Publikationen zeigten, dass Reorganisation und Neudefinierung der einzelnen Proben um 30-50% von den ursprünglich festgelegten Zuordnungen abweichen



(176). Daher wurden für die hier durchgeführten Analysen alle Proben einzeln und ungeachtet ihrer bisherigen Zuordnung neu gegen die Sequenzdatenbanken abgeglichen, so dass nicht zwangsläufig wie angegeben 11-20 Proben für jedes Gen auf dem Array vorhanden sind. Nach der Neuordnung liegen zwischen 5 und 97 Proben je genspezifischem Probensatz vor; insgesamt sind auf dem Array nach der Aktualisierung noch 11.732 verschiedene Annotationen für spezifische Gene repräsentiert.

#### **2.2.5.1. Generierung der Array-Daten**

Für die Analysen wurden zwei unabhängige Experimente mit jeweils siRNA gegen IGF-II (ds1 + ds3), INSR (ds1), IGF1R (ds3) und beide Rezeptoren (IGF1R/INSR) und nonsense siRNA durchgeführt. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen. Um die Auswirkungen der spezifischen mRNA-Reduktion auf die Genexpression analysieren zu können, wurden die Gesamt-RNA Isolate der verschiedenen siRNA-Transfektionen unter Verwendung des „GeneChip Expression 3'-Amplification Reagents One-Cycle cDNA Synthesis Kit“ durch Angliederung eines Linker-Oligonukleotides (T7-RNA-Polymerase Promotor) am 5'-Ende in cDNA umgeschrieben (177). Anschließend erfolgte eine *in vitro* Transkription unter Verwendung des „3'-Amplifikation Reagents for IVT Labeling“ Kits (Verwendung nach Angaben des Herstellers). Durch den Einbau von biotinyliertem UTP während der Transkription wird die cRNA für die Signaldetektion markiert. Die markierten cRNA Proben wurden fragmentiert und zur Hybridisierung auf je einen ‚*Human Genome U133A 2.0 Array*‘ aufgetragen.

Im Anschluß an die Hybridisierung wurde die Signalintensität nach Bindung des Farbstoffs Streptavidin-Phycoerythrin an das biotinylierte UTP gemessen. Dabei lässt die gemessene Signalintensität der einzelnen Probenpunkte (Array-Rohdaten) Rückschlüsse auf die Anzahl der Hybridisierungsereignisse und damit auf die Quantität der hybridisierten Transkripte zu.

#### **2.2.5.2. Bioinformatische Auswertung**

Die Auswertung wurde mit der SAS Micoarray 1.3 Software durchgeführt. Um die einzelnen Arrays miteinander vergleichen zu können, wurden die einzelnen Signale zunächst gegen die jeweilige durchschnittliche Signalintensität des Chips normalisiert werden.

Die so gewonnenen Daten der beiden unabhängigen Experimente wurden zu einem Mittelwert zusammengefasst. Jede Versuchsbedingung wurde gegen die unbehandelten Zellen bezüglich der Genexpression verglichen. Auf dem Niveau der einzelnen Proben in einem Probensatz wurde mittels des ‚Mixed Model ANOVA‘ Algorithmus die Signifikanz bestimmt. Zuerst wurden alle Gene, die nach einer Behandlung im Vergleich zu den unbehandelten Zellen eine

signifikante Modifikation aufwiesen detektiert. Da die Signifikanzberechnung auf dem Niveau der einzelnen Proben erfolgte, ermöglicht diese keine Rückschlüsse auf die Höhe der Regulation. Aufgrund der zum Teil hohen Probenzahl in einem Probensatz können auch Veränderungen um geringe Faktoren hoch signifikant detektiert werden. Eine Aussage über die biologische Relevanz kann nicht getroffen werden. Neben der Signifikanz, mit der sich die Genexpression in den jeweiligen Experimenten unterscheidet, wird auch die Information über das Ausmaß der Veränderung ermittelt. Aus den Signalintensitäten der einzelnen Probensätze ergibt sich in Folge verschiedener Algorithmen der ‚*LS Mean*‘ des jeweiligen Gens, eine relative Einheit der Signalstärke. Die Differenz der ‚*LS Mean*‘-Werte eines Gens bei unterschiedlichen Versuchsbedingungen ergibt die x-fache Veränderung (x-fold change) ausgedrückt als Logarithmus zur Basis 2 (Estimate<sup>Gen A</sup> Bedingung 1 vs Bedingung 2).

Beispiel:

$$\text{Estimate}_{\text{IGF1R vs unbehandelte Zellen}}^{\text{Gen A}} = \text{LS Mean}_{\text{IGF1R}}^{\text{Gen A}} - \text{LS Mean}_{\text{unbehandelte Zellen}}^{\text{Gen A}}$$

$$\text{x-fold change}_{\text{IGF1R vs unbehandelte Zellen}}^{\text{Gen A}} = 2^{\text{Estimate}_{\text{IGF1R vs unbehandelte Zellen}}^{\text{Gen A}}}$$

Die Auswertung erfolgte unter Verwendung der generierten signifikanten Expressionsveränderungen. Es wurden die Gene ermittelt, welche durch die Transfektion der verschiedenen siRNAs im Vergleich zu unbehandelten Zellen signifikant und biologisch relevant differentiell exprimiert wurden. Im weiteren Verlauf der Untersuchung wurden die Gene bestimmt, die nur durch eine genspezifische siRNA in ihrer Expression modifiziert wurden. Für die Auswahl dieser Gene wurden folgende Kriterien festgelegt:

1. Die Genexpression nach der siRNA Behandlung muss sich hochsignifikant ( $p < 0,001$ ) von der Expression in unbehandelten Zellen unterscheiden.
2. Die Genexpression muss mindestens um den Faktor  $\pm 1,5$  reguliert sein (biologisch relevant).
3. Die Expression des Gens darf nicht durch die Transfektion der nonsense siRNA signifikant und biologisch relevant reguliert sein.

Zur Analyse der durch IGF-II regulierten Gene wurde die Schnittmenge der durch die beiden siRNAs (IGF-II ds1 und IGF-II ds3) regulierten Gene gewählt. Die Auswahl der Schnittmenge erhöht die Spezifität, es werden nur Gene berücksichtigt, die spezifisch durch

beide siRNAs in ihrer Regulation verändert werden. Diese Schnittmenge wird nachfolgend nur mit ‚IGF-II‘ bezeichnet.

Zur leichteren Interpretation der Expressionsanalysen wurden verschiedene Schnittmengen und Expressionsgruppen anhand der zuvor genannten Kriterien erstellt. Sowohl spezifisch durch eine Versuchsbedingung regulierte Gene sowie durch verschiedene Versuchsbedingungen gleichartig regulierte Gene wurden so zusammengefasst:

- Gene, durch IGF1R siRNA ds3 reguliert
- Gene, durch INSR siRNA ds1 reguliert
- Gene, durch Rez. Mix reguliert
- Gene, durch IGF-II reguliert
- Gene, durch IGF1R und AUCH durch IGF-II reguliert
- Gene, durch INSR und AUCH durch IGF-II reguliert
- Gene, durch Rez. Mix und AUCH durch IGF-II reguliert
- Gene, durch IGF1R und AUCH durch INSR reguliert
- Gene, durch IGF1R und AUCH durch Mix reguliert
- Gene, durch Rez. Mix und AUCH durch INSR reguliert
- Gene, spezifisch durch IGF1R reguliert
- Gene, spezifisch durch INSR reguliert
- Gene, spezifisch durch IGF-II reguliert
- Gene, spezifisch durch Rez. Mix reguliert

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Optimierung des siRNA Transfektionsprozesses

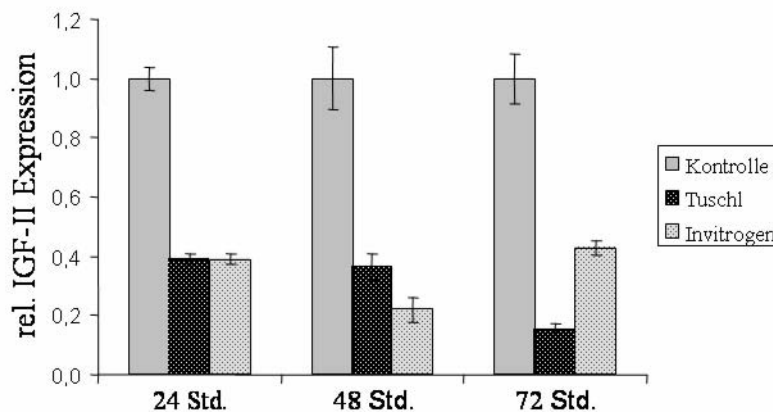
Es sind verschiedenen Methoden bekannt, um Zellen mit siRNA zu transfizieren. Abgesehen davon, dass nicht jedes Protokoll für jede Zelllinie geeignet ist, beeinflussen auch Umstände wie die Kulturbedingungen und die Zusammensetzung der Transfektionslösung die Transfektionseffizienz und somit die Wirksamkeit der eingebrachten siRNA. Um eine möglichst hohe Effizienz der RNA*interference* zu erzielen, wurden verschiedene experimentelle Parameter und ihr Einfluss auf die relative IGF-II mRNA Expression untersucht. Die letzten Endes effektivste Kombination aller Variablen ist im Material und Methoden Teil aufgeführt (2.2.1.5) und wurde für alle weiteren Experimente als Standardprotokoll verwendet. Für die hier gezeigten Optimierungsschritte wurden Huh-7-Zellen mit der siRNA IGF-II ds3 (siehe Material und Methoden) transfiziert. Als Maß für die Effizienz wurde mittels semiquantitativer PCR der IGF-II mRNA Gehalt der einzelnen Proben im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen bestimmt.

##### 3.1.1. Protokollauswahl

Getestet wurden zwei verschiedene Protokolle: das der Firma Invitrogen und das publizierte Protokoll der Arbeitsgruppe Tuschl (164). Die Protokolle unterscheiden sich nicht nur in der Konzentration der eingesetzten siRNA und des kationischen Karriers (Tuschl: 100 nM siRNA, Oligofectamin 0,5% [v/v]; Invitrogen: 200 nM siRNA, Oligofectamin 0,4% [v/v]), sondern auch in dem Medium, das für die Dauer der Transfektion eingesetzt wird. Während bei Tuschl für die Transfektion das normale Kulturmedium ohne Zugabe von Antibiotika verwendet wird, empfiehlt Invitrogen die Zellen in OptiMEM ohne weitere Zusatzstoffe zu transfizieren und die normalen Kulturbedingungen erst nach 4 Std. wieder herzustellen (Material und Methoden). Vierundzwanzig Stunden, 48 Std. und 72 Std. nach der Transfektion wurde Gesamt-RNA isoliert und die relative IGF-II Transkriptmenge im Vergleich zu unbehandelten Zellen analysiert (Abbildung 4).

Die Daten belegen, dass 72 Std. nach der Transfektion, anhand des von der Arbeitsgruppe um Tuschl entwickelten Protokolls, mit einer relativen Restmenge von 15% die geringste IGF-II mRNA Konzentration nachweisbar war. Das Invitrogen-Protokoll bewirkte zwar 48 Std. nach Transfektion eine deutliche Reduktion der IGF-II mRNA Expression (rel. IGF-II mRNA Konzentration 22%), allerdings stieg an Tag 3 (72 Std. nach Transfektion) die relative Transkriptmenge bereits wieder an, während sich bei der Transfektion nach dem von Tuschl publizierten Protokoll von Tag 2 zu Tag 3 eine weitere Reduktion zeigte. Für die Optimierung

weiterer Parameter wurde die Transfektion nach Tuschls publiziertem Protokoll durchgeführt, da durch dieses die deutlichste und nachhaltigste Reduktion der IGF-II mRNA Menge erzielt wurde.

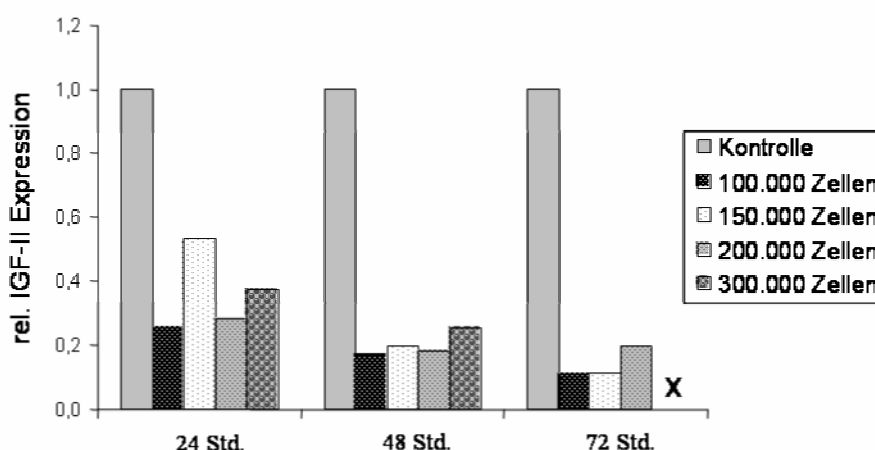


**Abbildung 4: Semiquantitative ‚realtime‘ PCR der IGF-II mRNA Expression nach siRNA Transfektion anhand verschiedener Transfektionsprotokolle**

Es wurde die relative Menge der IGF-II mRNA zu drei verschiedenen Zeitpunkten nach Transfektion einer IGF-II spezifischen siRNA bestimmt. Die Transfektion erfolgte nach zwei verschiedenen Protokollen, die sich sowohl in der Konzentration der Zusätze als auch im verwendeten Medium unterschieden. Als Kalibrator dienten die unbehandelten Zellen des jeweiligen Zeitwertes.

### 3.1.2. Optimierung der Transfektionseffizienz hinsichtlich der Zelldichte

Aufbauend auf dem Protokoll nach Tuschl erfolgte anschließend die Optimierung der Zelldichte.



**Abbildung 5: Einfluss der Zelldichte auf die siRNA-vermittelte IGF-II mRNA Reduktion**

Unterschiedliche Zelldichten wurden mittels Oligofectamin in ihrem Standardmedium ohne Antibiotika transfiziert und zu drei verschiedenen Zeitpunkten mittels semiquantitativer ‚realtime‘ PCR bezüglich der IGF-II mRNA Reduktion analysiert. Der 72 Std. Wert der 300.000 Zellen Probe konnte nicht mehr bestimmt werden, da die Zellen aufgrund der hohen Zelldichte nicht mehr analysierbar waren. Die relative IGF-II mRNA Konzentration wurde für jeden Zeitpunkt im Vergleich zu IGF-II Menge unbehandelter Zellen (200.000 Zellen ausgesät) bestimmt.

Um den Einfluss der Zelldichte auf die Transfektionseffizienz und die damit verbundene IGF-II mRNA Reduktion bestimmen zu können, wurden unterschiedliche Zellzahlen ausgesät und einheitlich mit IGF-II spezifischer siRNA transfiziert. Vierundzwanzig, 48 und 72 Std. nach der Transfektion wurde die relative IGF-II mRNA Konzentration im Vergleich zu unbehandelten Zellen bestimmt. Wie die Auswertung mittels semiquantitativer ‚*realtime*‘ PCR zeigt (Abbildung 5), nahm die Transfektionseffizienz mit zunehmender Zellzahl zum Zeitpunkt der Transfektion ab. Da die Menge der isolierten RNA bei der Aussaat von 100.000 Zellen mit Ausbeuten  $<100 \text{ ng}/\mu\text{l}$  sehr niedrig war und diese Zellzahl für weitere Analysen zu gering erschien, wurde die Zellzahl  $1,5 \times 10^5$  pro  $10 \text{ cm}^2$  als geeignete Menge gewählt. Zwar konnte bei dieser Zellzahl nach 24 Std. im Vergleich zu den anderen Proben keine maximale Reduktion erzielt werden, aber nach 72 Std. lag mit einer Reduktion von 89% das beste Ergebnis, im Vergleich zu allen anderen Zellzahlen über alle Zeitwerte betrachtet, vor. Für alle weiteren Experimente wurden  $1,5 \times 10^5$  pro  $10 \text{ cm}^2$  Zellen ausgesät.

### 3.1.3. Optimierung der Transfektionsdauer und Einfluss der Zugabe von Antibiotika bezüglich der IGF-II mRNA Reduktion nach siRNA Transfektion

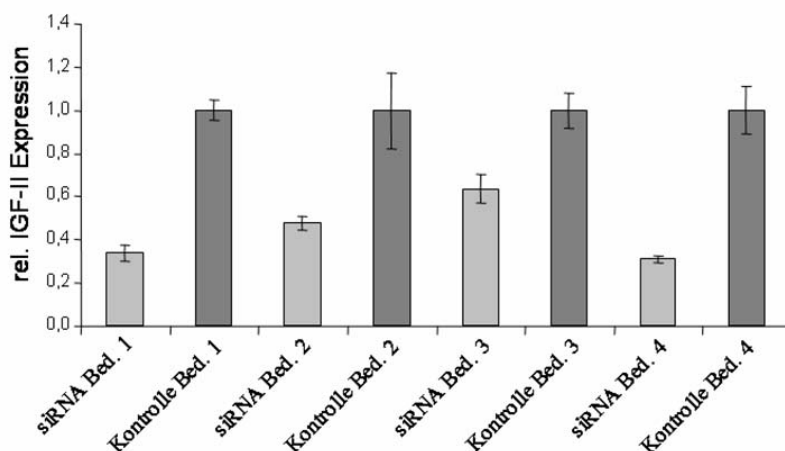
Die Transfektion erfolgte prinzipiell ohne Antibiotikum. Um zu testen, ob die spätere Zugabe von Penicillin und Streptomycin auf die Konzentration der IGF-II mRNA nach siRNA Transfektion Einfluss hat, und ob durch eine längere Einwirkzeit der Transfektionslösung eine höhere Reduktion erzielt werden kann, wurden Zellen unter verschiedenen Bedingungen transfiziert (Tabelle 2).

Bedingung	Zeitpunkt und Art des Mediumwechsels	Antibiotikazusatz
Bedingung 1	nach 4 Std. Zugabe des 1-fachen Volumens DMEM	ja
Bedingung 2	nach 4 Std. vollständiger Austausch gegen DMEM	ja
Bedingung 3	nach 4 Std. vollständiger Austausch gegen DMEM	nein
Bedingung 4	nach 24 Std. vollständiger Austausch gegen DMEM	nein

**Tabelle 2: Zusammenfassungen der Bedingungen der IGF-II siRNA Transfektion zur Optimierung der Transfektionsdauer und zur Überprüfung des Einflusses von Antibiotika.**

Die Transfektion erfolgte für alle vier Bedingungen in antibiotika-freiem DMEM. Bei der nachträglichen Gabe von Antibiotika wurde nach 4 Std. antibiotikahaltiges Medium zum Transfektionsansatz zugegeben (Bedingung 1) oder das Transfektionsmedium vollständig gegen DMEM mit Penicillin/Streptomycin ausgetauscht (Bedingung 2). Außerdem erfolgte die Inkubation der Zellen im Transfektionsmedium für 4 Std. (Bedingung 3) bzw. 24 Std.

(Bedingung 4) und diese Zellen wurden bis zur RNA-Isolierung nach 48 Std. auch weiterhin ohne die Zugabe von Antibiotika kultiviert.



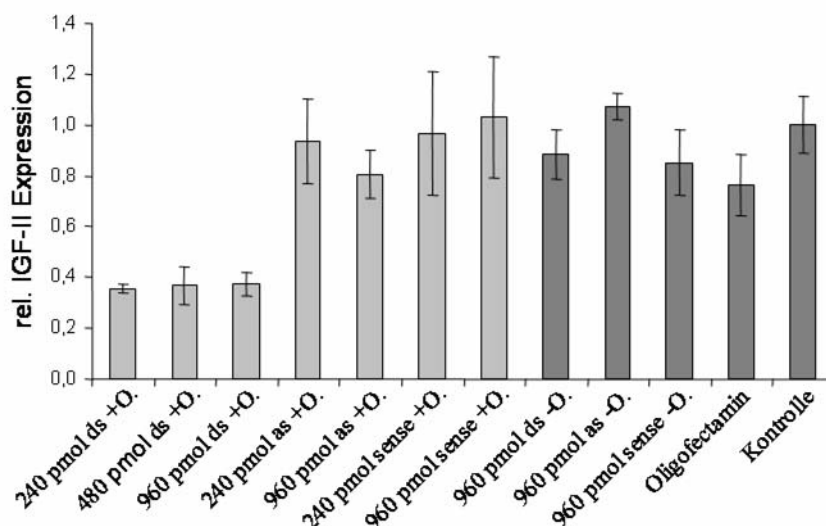
**Abbildung 6: Einfluss der Inkubationsdauer und der Zugabe von Antibiotika auf die IGF-II mRNA Reduktion nach siRNA Transfektion**

Nach der Transfektion IGF-II spezifischer siRNA wurden die Zellen unter den in Tabelle 1 angegebenen Bedingungen kultiviert. Die RNA-Isolierung erfolgte nach 48 Std. und mittels semiquantitativer *realtime* PCR wurden die jeweiligen relativen IGF-II Konzentrationen bestimmt. Als Kalibrator dienten die unter den entsprechenden Bedingungen kultivierten unbehandelten Zellen (dunkle Balken).

Die durchgeführte Analyse zeigte, dass die Zugabe von Antibiotika die Effizienz der RNA Reduktion nicht maßgeblich beeinflusste (Abbildung 6, siRNA Bedingung1 (34%) vs siRNA Bedingung 4 (31%)), während eine längere Transfektionsdauer die relative mRNA Konzentration reduziert (Abbildung 6, siRNA Bedingung 2 (48%) und Bedingung 3 (64%) vs. siRNA Bedingung4 (31%)). Da die geringste IGF-II Menge in Zellen, die vollständig antibiotikafrei und ü.N. transfiziert wurden, detektiert werden konnte, wurden diese Parameter als weitere Transfektionsbedingungen im Standardprotokoll aufgenommen

### 3.1.4. Optimierung der siRNA Konzentration und Analyse der Wirkung einzelsträngiger RNA auf die IGF-II mRNA Konzentration

Diese Experimente sollten klären, ob höhere Konzentrationen der siRNA zu einer effizienteren Reduktion führen, und ob diese Effekte auch mit einzelsträngiger RNA erzielt werden können. Ferner sollte analysiert werden, ob die bloße Zugabe von RNA ohne Transfektionsreagenz unspezifische Veränderungen der IGF-II Expression bewirkt. Daher wurden Huh-7-Zellen mit 100 nM, 200 nM und 400 nM siRNA und 100 nM und 400 nM einzelsträngiger RNA (sense und antisense) mit und ohne Zugabe von Oligofectamin nach dem bisher etablierten Standardprotokoll inkubiert.



**Abbildung 7: Einfluss der Menge IGF-II spezifischer siRNA und des Transfektionsreagenzes auf die genspezifische Inhibierung.**

Die relative IGF-II mRNA Konzentration 48 Std. nach der Transfektion von 240 pmol [100 nM], 480 pmol [200 nM] und 960 pmol [400 nM] einzel- und doppelsträngiger RNA in Huh-7-Zellen. Die Zugabe von RNA ohne kationischen Karrier diente neben der Inkubation mit dem Transfektionsreagenz und unbehandelten Zellen (Kalibrator) als Kontrolle (dunkle Balken) und zeigte in der semiquantitativen ‚realtime‘ PCR keine deutlichen Effekte. (+O.: Zugabe von Oligofectamin zum Transfektionsansatz, -O.: keine Oligofectaminzugabe, as: antisense (einzelssträngige RNA)).

Die Daten der ‚realtime‘ PCR (Abbildung 7) zeigen deutlich, dass nur die doppelsträngige siRNA zusammen mit dem Transfektionsreagenz zu einer effizienten Reduktion der IGF-II mRNA Expression um 63-64% führte. Als Vergleich dienten die unbehandelten Zellen (Kalibrator), deren relative IGF-II Menge als 100% berücksichtigt wurde. Alle anderen Proben, die mit einzelsträngiger RNA, nur mit RNA ohne Oligofectamin oder nur mit Oligofectamin inkubiert wurden, zeigten im Vergleich zu den unbehandelten Zellen keine deutliche Veränderung der relativen IGF-II Konzentration (von 81% rel. IGF-II Menge bei 960 pmol antisense mit Oligofectamin bis zu 107% rel. IGF-II Menge bei 960 pmol antisense ohne Oligofectamin). Da durch eine Erhöhung der Konzentration keine Verbesserung erzielt werden konnte, wurde die Transfektion mit einer Konzentration von 100 nM siRNA für alle folgenden Experimente durchgeführt.

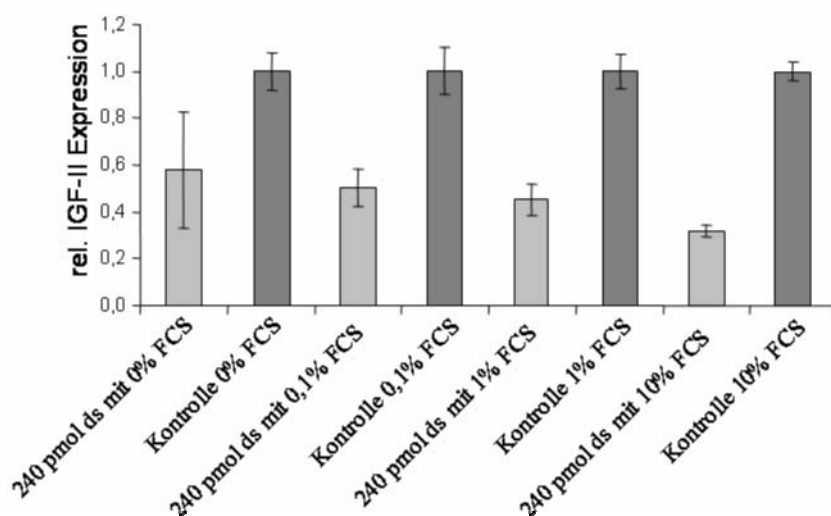
### 3.1.5. Optimierung der Transfektionseffizienz in Abhängigkeit von der FCS-Konzentration

Als letzter Parameter der Kulturbedingungen wurde die Bedeutung der FCS-Konzentration analysiert. Da bekannt ist, dass die Reduktion der Serumgabe die Zellen z.B. für chemotherapeutische Stimuli empfänglicher macht, wurde getestet, ob geringere FCS-Mengen zu einer verbesserten mRNA-Reduktion führen.

Die Transfektion der Zellen erfolgte unter Zugabe von 0%, 0,1%, 1% und 10% FCS. Anschließend wurden die Zellen für 2 Tage mit der entsprechenden FCS-Konzentration



kultiviert. Die TaqMan-Analyse verdeutlicht, dass eine FCS-Reduktion nicht mit einer Steigerung der Transfektionseffizienz einherging (Abbildung 8). Je geringer die Serumkonzentration im Medium war, desto höher das Expressionsniveau des IGF-II. Die Transfektion und Inkubation mit 0% FCS Zugabe zum Medium erbrachte nur eine 42%ige Reduktion im Vergleich zu unbehandelten Zellen unter gleichen Kulturbedingungen. Ein Zusatz von 10% FCS zum Serum erzielte bei sonst gleichen Versuchsbedingungen eine 68%ige Reduktion der rel. IGF-II Transkript-Menge. Aufgrund dieses Ergebnisses erfolgten alle weiteren Transfektionen bei Kulturbedingungen mit 10% FCS im Medium.



**Abbildung 8: Einfluss der FCS-Konzentration auf die Reduktion der IGF-II Expression**

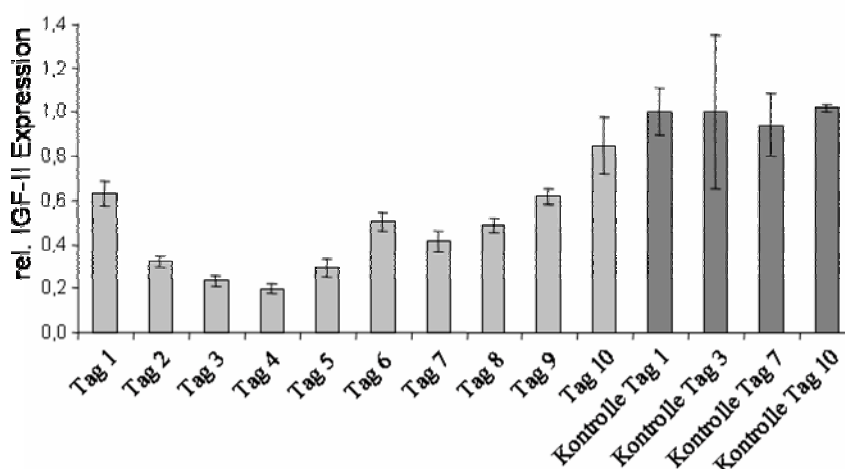
Die TaqMan Analyse zeigt, dass die Reduktion der Serumkonzentration zu einer verringerten Transfektionseffizienz von IGF-II spezifischer siRNA führte (helle Balken = Inhibierungen bei variierenden FCS-Konzentrationen; dunkle Balken = Kontrollen mit jeweiliger FCS-Konzentration).

### 3.1.6. Optimierung der Transfektionseffizienz hinsichtlich der Kulturdauer nach siRNA Transfektion

Für alle weiteren Analysen, wie die Beeinflussung nachgeschalteter Proteine, ist es von zentraler Bedeutung, den zeitlichen Verlauf der mRNA-Reduktion mittels RNAi zu kennen. Zu diesem Zweck wurde über einen Zeitraum von 10 Tagen die IGF-II mRNA Expression in mit IGF-II spezifischer siRNA transfizierten Huh-7-Zellen analysiert (Abbildung 9). Da bei längeren Zeitabschnitten die Kultivierung der Zellen ohne passagieren nicht möglich ist, wurde außerdem untersucht, ob das Passagieren von transfizierten Zellen einen Einfluss auf die Inhibierungseffizienz hat.

Der maximale Effekt auf RNA-Ebene zeigte sich mit einer Reduktion der relativen IGF-II mRNA Menge um 80% 4 Tage nach der Transfektion. Danach stieg die Expression über einen Zeitraum von 6 Tagen fast auf das normale Expressionslevel an, die relative IGF-II mRNA Konzentration lag nach 10 Tagen im Vergleich zu nicht-transfizierten Zellen bei 85%.

Hinsichtlich der Expression der IGF-II mRNA erwies es sich als unerheblich, ob die Zellen nach der Transfektion passagiert wurden oder nicht (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 9: Zeitkinetik der mRNA Expression nach siRNA Transfektion**

Der Verlauf der IGF-II mRNA Reduktion wurde über 10 Tage nach IGF-II spezifischer siRNA Transfektion (helle Balken) mittels semiquantitativer ‚*realtime*‘ PCR beobachtet. An vier Tagen wurden repräsentativ die IGF-II mRNA Menge unbehandelter Zellen bestimmt (dunkle Balken), als Kalibrator für alle Werte diente die relative IGF-II Konzentration der Kontrolle Tag 10.

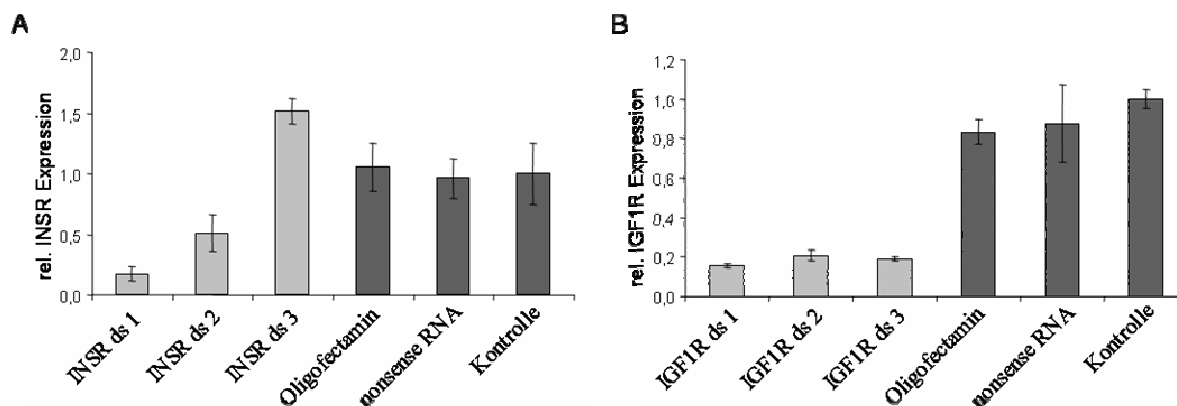
Sofern nicht anders angegeben, wurde das hier etablierte Protokoll (2.2.1.5) für alle siRNA Transfektionsexperimente herangezogen. Alle in der Arbeit gezeigten Untersuchungen erfolgten an Tag drei oder vier nach der Inhibierung. Einzige Ausnahme war der MTT-Test zur Vitalitätsbestimmung. Hierfür wurden die Zellen 24 Std. nach der Inhibierung ausgezählt und für 4-6 Tage weiter kultiviert und dann analysiert.

### 3.2. IGF1R- und INSR-Reduktion mittels genspezifischer RNAi

Es ist bekannt, dass der Wachstumsfaktor IGF-II im Rahmen der Hepatokarzinogenese in die Prozesse Proliferation und Anti-Apoptose involviert ist. Somit bietet die IGF-Signalwegsachse einen molekularen Ansatzpunkt für potentielle therapeutische Interventionen oder die Sensibilisierung gegen Chemotherapeutika. Ziel dieser Experimente war es, herauszufinden, welcher der beiden in die Signaltransduktion von IGF-II involvierten Rezeptoren hauptsächlich die proliferativen und antiapoptotischen Effekte des Wachstumsfaktors im HCC vermittelt. Es sollten deshalb die Expression des IGF1-Rezeptors (IGF1R) und des Insulinrezeptors (INSR) sowohl einzeln als auch in Kombination mittels RNAi inhibiert werden, und die daraus resultierenden funktionellen Auswirkungen analysiert werden.

### 3.2.1. IGF1R- und INSR-mRNA Reduktion durch genspezifische siRNA Transfektion

Sowohl Huh-7 wie auch Hep3B-Zellen wurden mit je drei verschiedenen gegen IGF1R und INSR gerichteten siRNAs transient transfiziert. Die an Tag 4 nach der Transfektion isolierte mRNA wurde in einer semiquantitativen ‚*realtime*‘ PCR auf die jeweilige Rezeptorexpression hin untersucht (Huh-7: Abbildung 10; Hep3B: Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 10: Relative IGF1R- und INSR-mRNA Expression nach siRNA Transfektion in Huh-7**

Vier Tage nach Transfektion INSR-spezifischer (Abb. A) und IGF1R-spezifischer (Abb. B) siRNA wurde die Gesamt-RNA isoliert und mittels semiquantitativer ‚*realtime*‘ PCR die relative Rezeptorkonzentration im Vergleich zu unbehandelten Zellen (Kontrolle = Kalibrator) bestimmt (Inhibierung: helle Balken; Kontrollen: dunkle Balken).

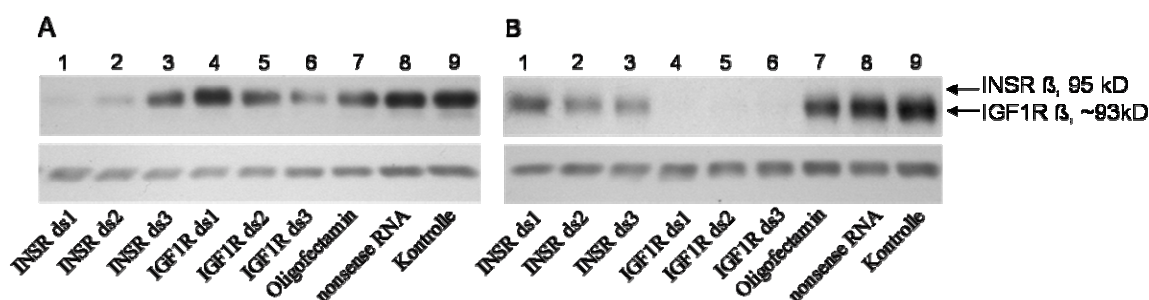
Wie die semiquantitative Analyse zeigt, führte die Behandlung der Huh-7-Zellen mit der siRNA INSR ds1 zu einer Reduktion der Rezeptor mRNA-Expression um 82%, während die beiden anderen gegen den Insulinrezeptor gerichteten siRNAs keine adäquate Verringerung der Expression herbeiführen konnten (rel. INSR-Konzentration INSR ds2: 51%; INSR ds3: 152%; Abbildung 10A). Im Gegensatz dazu konnte die IGF1R-mRNA Konzentration durch alle drei siRNA Sequenzen um ca. 80% reduziert werden (Abbildung 10B). In beiden Experimenten konnte weder durch die Inkubation der Zellen mit dem Transfektionsreagenz noch durch die Transfektion der nonsense siRNA eine Beeinflussung der Rezeptor-mRNA Konzentration im Vergleich zu den unbehandelten Zellen (Kontrolle) nachgewiesen werden. In den Hep3B-Zellen ist die Expressionsreduktion, die durch die Transfektion genspezifischer siRNA erzielt wurde, mit den Ergebnissen der hier gezeigten Transfektion der Huh-7-Zellen vergleichbar. Die gegen den INSR gerichtete siRNA ds1 reduzierte die relative Konzentration des Rezeptors um 81%, der IGF1R wurde durch die drei verschiedenen siRNAs um 72-83% reduziert (Daten nicht gezeigt).

Die Daten belegen, dass durch transiente siRNA Transfektion eine bis zu 83%ige Reduktion der mRNA Konzentration erzeugt werden kann.

### 3.2.2. Reduktion des INSR und des IGF1R auf Proteinebene

Vier Tage nach der genspezifischen siRNA Transfektion wurden Gesamtproteinfraktionen isoliert, um zu prüfen, ob die Reduktion auf mRNA Ebene auch zu einer Verringerung der Proteinmenge führt.

Im Rahmen der Proteinanalyse wurden auch die Proteinextrakte der mit IGF1R siRNA (IGF1R ds1-3) transfizierten Zellen mit dem INSR Antikörper inkubiert und die der INSR siRNA (INSR ds1-3) transfizierten Zellen mit dem IGF1R, um eventuelle Kreuzreaktionen der siRNAs aufgrund vorhandener Nukleinsäure-Sequenzhomologien ausschließen zu können.



**Abbildung 11: INSR/IGF1R-Proteinreduktion nach genspezifischer siRNA Transfektion**

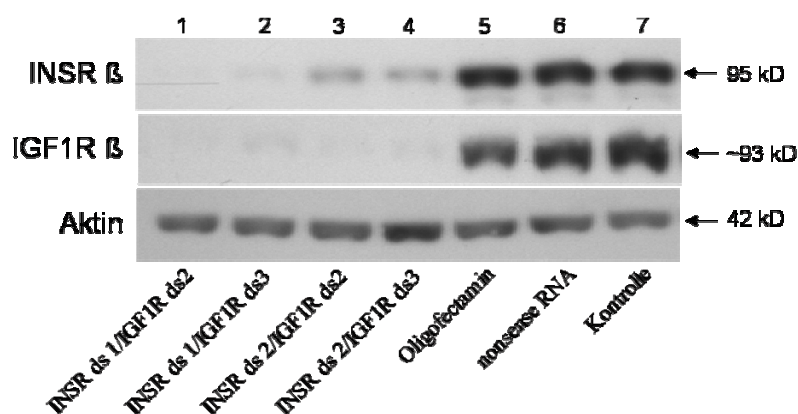
Proteinextrakte von Zellen, mit INSR-spezifischer siRNA (Spuren 1-3) oder mit IGF1R-spezifischer siRNA (Spuren 4-6) transfiziert, wurden sowohl auf die Expression des INSR (Abb. A) als auch auf die des IGF1R (Abb. B) hin untersucht. Als Vergleichswert diente die Proteinkonzentration in Zellen, die nur mit dem Transfektionsreagenz inkubiert, mit nonsense siRNA transfizierte oder unter normalen Standardbedingungen kultiviert (Kontrolle) wurden.

Wie sich schon bei der mRNA Expression in der TaqMan Analyse andeutete (Abbildung 10), erzielte INSR ds1 eine vollständige Reduktion des Insulinrezeptors in Huh-7-Zellen auf Proteinebene (Abbildung 11A, Spur 1). Verglichen mit INSR ds2 und INSR ds3 hatte siRNA INSR ds1 auch die geringste Auswirkung auf die IGF1R-Expression (Abbildung 11B). Ebenfalls durch die TaqMan-Analyse bestätigt, erzielten alle gegen den IGF1R gerichteten siRNAs eine nahezu vollständige Reduktion des Proteins (Abbildung 11B, Spuren 4-6). Während siRNA IGF1R ds1 keinen und siRNA IGF1R ds2 einen mäßigen Einfluss auf die Expression des INSR hatte (Abbildung 11A, Spur 4 und 5), führte IGF1R ds3 zu einer erkennbaren Reduktion des Insulin Rezeptors (Abbildung 11A, Spur 6).

Um zu prüfen, ob bei gleichzeitiger Reduktion beider Rezeptoren die Effekte über einen alternativen Rezeptor vermittelt bzw. einen weiteren Signalweg kompensiert werden können, wurde eine gleichzeitige Inhibierung beider Rezeptoren angestrebt. Dafür wurden die Zellen mit einer äquimolaren Menge zweier siRNAs transfiziert und im Western Blot auf ihre Proteinkonzentration hin überprüft. Bei der Kombination der siRNAs wurden die siRNA INSR ds3 wegen ihrer schlechten Inhibierungseffizienz nicht berücksichtigt. Bei den IGF1R-

spezifischen siRNAs wurde auf siRNA IGF1R ds1 verzichtet, da sie zu einer Induktion des Insulinrezeptors führte (relative Induktion im Vergleich zu unbehandelten Zellen in der semiquantitativen ‚*realtime*‘ PCR: 196%)

Durch die gleichzeitige Transfektion zweier genspezifischer siRNAs konnte eine vollständige Unterdrückung der Rezeptorproteinbiosynthese erzielt werden. Im Western Blot wurde bei zwei der verwendeten siRNA Kombinationen keines der Rezeptorproteine nachgewiesen (Abbildung 12, Spur 1 und 2). Die Transfektion der nonsense siRNA und eine Inkubation der Zellen mit dem Transfektionsreagenz beeinflussten die Rezeptorkonzentration im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen nicht.

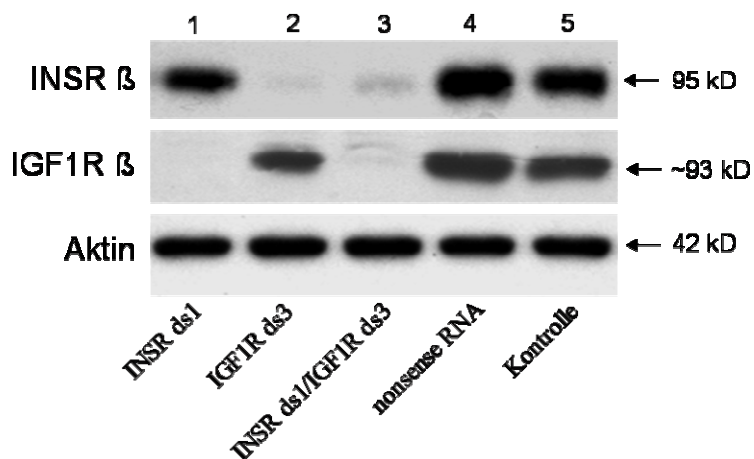


**Abbildung 12: Doppelinhibierung des INSR/IGF1R mittels RNAi in Huh-7-Zellen**

Vier Tage nach der gleichzeitigen Transfektion von INSR-spezifischer und IGF1R-spezifischer siRNA wurde die Proteinmenge im Western Blot bestimmt. In den Proben in Spur 1 und 2 war eine deutliche Reduktion des Proteingehaltes im Vergleich zu allen Kontrollbehandlungen (Spur 5-7) nachweisbar.

Unter Berücksichtigung aller durchgeführten Analysen waren die siRNAs INSR ds1 und IGF1R ds3 für die alleinige und die kombinierte Rezeptorinhibierung am besten geeignet.

In Hep3B-Zellen konnte durch die genspezifische siRNA Transfektion ebenfalls ein nahezu vollständiger Verlust der jeweiligen Proteinsignale im Western Blot nachgewiesen werden. Die Zellen wurden mit den bei den Huh-7-Zellen effizientesten siRNAs INSR ds1, IGF1R ds3 und ihrer Kombination transfiziert (Abbildung 13).

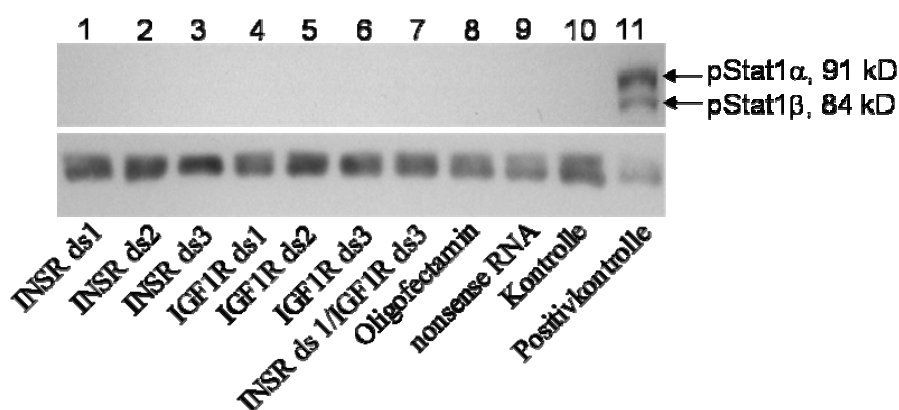


**Abbildung 13: INSR- und IGF1R-Proteinreduktion in Hep3B nach siRNA Transfektion**

Vier Tage nach der Transfektion der genspezifischen siRNAs INSR ds1 und IGF1R ds3 allein (Spur 1 und 2) oder in Kombination (Spur 3) wurde die jeweilige Proteinmenge im Western Blot überprüft.

### 3.2.3. Überprüfung einer unspezifischen Interferonantwort nach siRNA Transfektion

Das Einbringen von dsRNA in die Zellen kann eine unspezifische Interferonantwort induzieren, die das Proliferations- und Wachstumsverhalten von Zellen maßgeblich beeinflusst. Um dieses auszuschließen, wurde mit Hilfe eines phosphorylierungsspezifischen Antikörpers gegen Stat1, ein zytoplasmatisches Signalmolekül innerhalb der Signalkaskade einer Interferonantwort, dessen Phosphorylierungsstatus als Zeichen seiner Aktivität überprüft. Die Zellen wurden nach dem Standardprotokoll transfiziert und nach vier Tagen Gesamtproteinextrakte isoliert; als Positivkontrolle wurde eine Proteinfraction Interferon-behandelter Zellen eingesetzt (Abbildung 14).



**Abbildung 14: Stat1 Phosphorylierungszustand nach siRNA Transfektion in Huh-7-Zellen**

Die Transfektion genspezifischer siRNAs und der entsprechenden Kontrollen erfolgte nach dem Standardprotokoll. Vier Tage nach Transfektion wurden die verschiedenen Proben (Spur 1-10) auf die Phosphorylierung des Stat1 (Tyr<sup>701</sup>) Enzyms überprüft. Als Positivkontrolle diente ein Proteinextrakt Interferon behandelter Zellen.

Die fehlende Phosphorylierung der beiden Stat1 Splicevarianten (Stat1 $\alpha$  und Stat1 $\beta$ ) in allen Proben des Transfektionsversuches zeigt deutlich, dass diese Komponente des Interferonsignalweges durch die siRNA Transfektion nicht aktiviert wurde. In Hep3B-Zellen konnte ebenfalls keine Stat1 Phosphorylierung durch das Einbringen genspezifischer siRNA nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Auch die Überprüfung der Expression des Interferon-Zielgens OAS 2 (2'-5' Oligoadenylate Synthetase 2) anhand einer RT-PCR sowohl in Huh-7- wie auch in Hep3B-Zellen gab keine Hinweise auf eine durch siRNA-induzierte Interferonantwort (Daten nicht gezeigt).

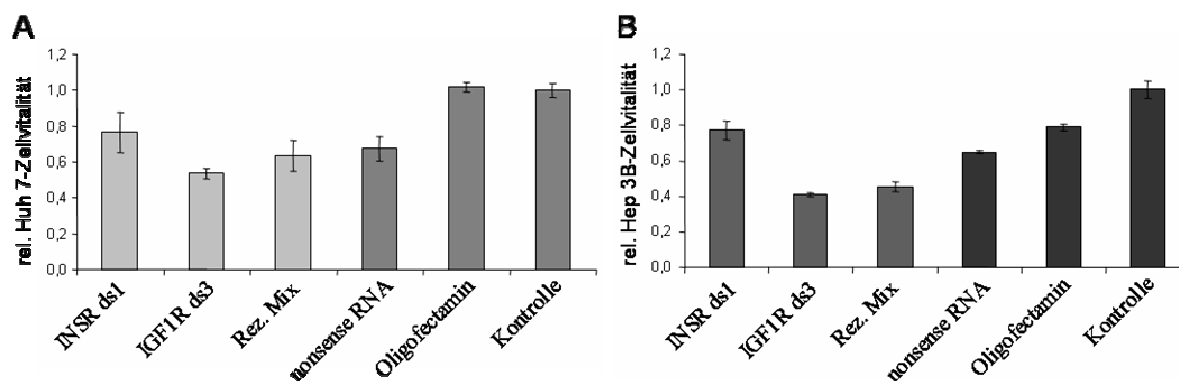
### 3.2.4. Auswirkungen der Rezeptorreduktion auf HCC-Zellvitalität

Nachdem die genspezifische Reduktion beider Rezeptoren sowohl auf RNA- wie auch auf Proteinebene nachgewiesen und die Aktivierung einer unspezifischen Interferonantwort



ausgeschlossen wurde, konnte die Untersuchung der funktionellen Effekte nach Rezeptorinhibierung erfolgen.

Zunächst wurde die Auswirkung der genspezifischen siRNA Transfektion auf die Zellvitalität sowohl in Huh-7 (Abbildung 15A) wie auch in Hep3B-Zellen (Abbildung 15B) mittels MTT-Test (2.2.4.1) untersucht.



**Abbildung 15: Einfluss der Rezeptorreduktion auf die Zellvitalität**

Der Zellvitalitätstest zeigt die relative Anzahl stoffwechselaktiver Zellen siRNA transfizierter Proben (helle Balken) im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen (dunkle Balken). Huh-7 (Abb. A) und Hep3B (Abb. B) wurden nach dem Standardprotokoll mit den entsprechenden siRNAs transfiziert und für weitere 5 Tage kultiviert. Die dargestellten Balken sind Mittelwerte von 6 Proben mit der entsprechenden Standardabweichung.

Im Vergleich zu nonsense siRNA Kontrolle war in den Huh-7-Zellen die Vitalität der IGF1R ds3 transfizierten Zellen signifikant reduziert (relative Restvitalität von 54%,  $p=0,003$ ). In Hep3B-Zellen wurde außer durch die IGF1R-Reduktion (relative Restvitalität 41%,  $p=1,6 \times 10^{-11}$ ) auch durch die gleichzeitige Reduktion beider Rezeptoren eine signifikante Verringerung der Anzahl stoffwechselaktiver Zellen erzielt (relative Restvitalität 45%,  $p=2,9 \times 10^{-6}$ ). Es ist bemerkenswert, dass auch die Transfektion der *non-silencing* nonsense siRNA eine erhebliche Reduktion der Zellvitalität verursachte (relative Restvitalität 67% in Huh-7 bzw. 65% in Hep3B).

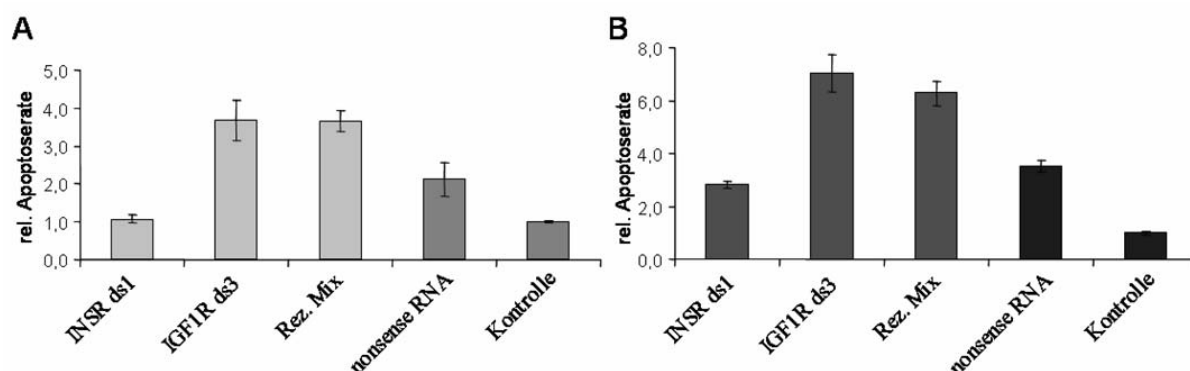
Da dieser Assay nicht ermöglicht, bei den beobachteten Effekten zwischen Proliferationsreduktion und Apoptoseinduktion zu unterscheiden, wurden diesbezüglich weitere Analysen vorgenommen.

### 3.2.5. Beeinflussung der Tumorzell-Apoptose nach Reduktion der Rezeptorexpression

Die durch die Transfektion der Rezeptor-spezifischen siRNA-induzierte Apoptose wurde mittels FACS-Analyse bestimmt.

Die alleinige Reduktion des IGF1R wie auch die kombinierte Reduktion des IGF1R und INSR führte sowohl in Huh-7 (Abbildung 16A) wie auch in Hep3B-Zellen (Abbildung 16B) zu einer signifikanten Zunahme der Apoptose ( $p<0,02$ ) verglichen mit den nonsense siRNA

transfizierten Zellen. In den Huh-7-Zellen war die Anzahl apoptotischer Zellen durch alleinige IGF1R-Reduktion und die kombinierte Behandlung um den Faktor 3,6 erhöht. In Hep3B-Zellen lag die Apoptoserate beim 7-fachen (IGF1R) bzw. beim 6,2-fachen (Rez. Mix) im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen. Die Reduktion des INSR hatte im Vergleich zur nonsense siRNA transfizierten Kontrolle keinerlei Einfluss auf die Induktion der Apoptose.



**Abbildung 16: Zusammenfassende Darstellung der FACS-Analyse siRNA transfizierter Huh-7- und Hep3B-Zellen**

Huh-7 (Abb. A) und Hep3B (Abb. B) wurden in Dreifachansätzen mit INSR- und IGF1R-spezifischer siRNA transfiziert und nach vier Tagen auf die Anzahl apoptotischer Ereignisse hin untersucht. In FACS-Analysen wurde anhand der Fluoreszenzintensität, die mit der DNA-Degradation korreliert, die Apoptoserate in den Inhibierungen (helle Balken) im Vergleich zu den Kontrollen (dunkle Balken) bestimmt.

Das Ausmaß der Effekte durch die RNAi, die im MTT-Test (Abbildung 15) ermittelt werden konnten, deckten sich mit dem in der FACS-Analyse gezeigten Apoptoseverhalten. Daher kann man annehmen, dass der zuvor gezeigte Vitalitätsverlust maßgeblich auf eine Apoptoseinduktion zurückzuführen ist.

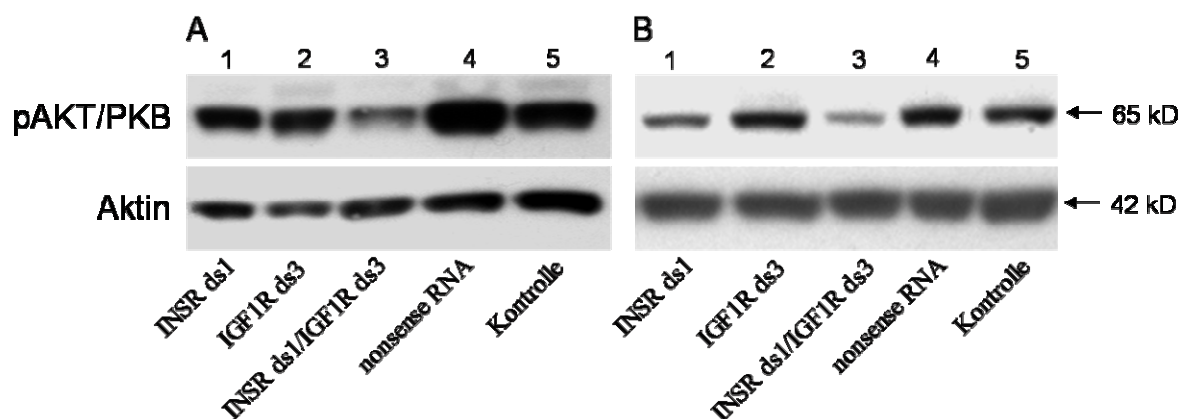
### 3.2.6. Effekte der reduzierten Rezeptorexpression auf den Phosphorylierungsstatus von Signalmolekülen

Um weitere Beweise für die spezifische Modulation der Tumorzellfunktion nach Inhibierung der Rezeptoren zu erhalten, wurde mit der Aktivitätsbestimmung bekannter Downstream Effektoren der beiden Rezeptoren begonnen. Hierfür wurde zunächst der Phosphorylierungszustand der Proteinkinase B (AKT/PKB) im Western Blot untersucht (Abbildung 17).

Obwohl in Huh-7-Zellen (Abbildung 17A) sowohl durch die alleinige Reduktion der einzelnen Rezeptoren (Spur 1 und 2) ein leichter Rückgang der AKT/PKB Phosphorylierung im Vergleich zu den Kontrollen (Spur 4 und 5) erzielt wurde, zeigte die gleichzeitige Inhibierung beider Rezeptoren deutlich stärkere Effekte (Spur 3). Das gleiche Phänomen wurde in Hep3B-Zellen beobachtet (Abbildung 17B), in denen die siRNA-Inhibierung des



Insulinrezeptors (Spur 1) allein stärkere Effekte hervorrief als die des IGF1R (Spur 2). Aber auch hier erfolgte die effektivste Dephosphorylierung von AKT/PKB durch die gleichzeitige Reduktion beider Rezeptoren (Spur 3).



**Abbildung 17: Phosphorylierungszustand von AKT/PKB nach Rezeptor Reduktion**

Vier Tage nach der Transfektion der genspezifischen siRNA in Huh-7- (Abb. A) und Hep3B-Zellen (Abb. B) wurden die Proteinextrakte im Western Blot auf den Phosphorylierungsstatus der Proteinkinase B (AKT/PKB) untersucht.

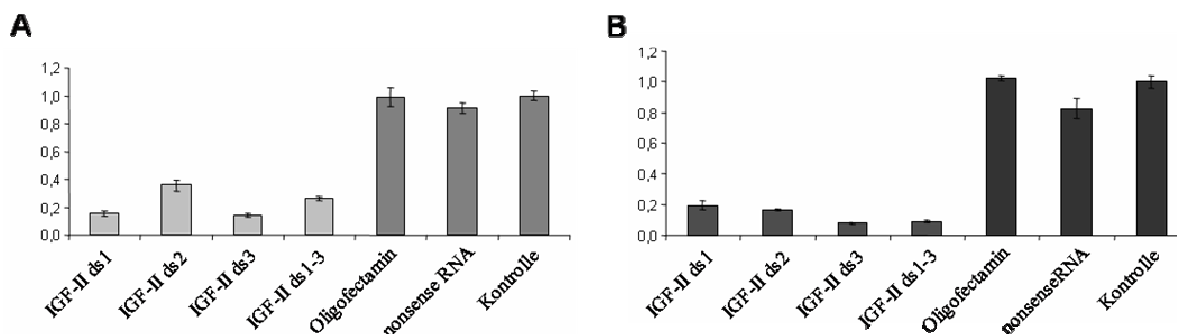
Diese Daten weisen darauf hin, dass nicht einer der beiden Rezeptoren hauptsächlich die IGF-II Effekte vermittelt, sondern IGF-II alternativ beide Rezeptoren zur Signaltransduktion nutzen kann.

### 3.3. IGF-II Reduktion mittels genspezifischer RNAi

Die Reduktion des Liganden erfolgte ebenfalls durch die Transfektion von drei IGF-II spezifischen siRNAs in HCC Zelllinien. Wie schon bei der Rezeptorreduktion sollten im Anschluss an die nachweislich erbrachte Reduktion des Liganden Experimente durchgeführt werden, die Aufschluss über Zellvitalität, Proliferation, Apoptose und die Aktivität von zytoplasmatischen Downstream-Signalmolekülen geben.

#### 3.3.1. IGF-II mRNA Reduktion durch genspezifische siRNA Transfektion

Die beiden Zelllinien Huh-7 und Hep3B wurden mit drei siRNAs verschiedener Sequenz und einer Mischung dieser drei RNAs transfiziert, wobei die siRNA Konzentration in allen vier Ansätzen identisch war. Vier Tage nach Transfektion wurde die RNA isoliert und mittels semiquantitativer ‚*realtime*‘ PCR auf die relative IGF-II Konzentration hin analysiert (Abbildung 18).



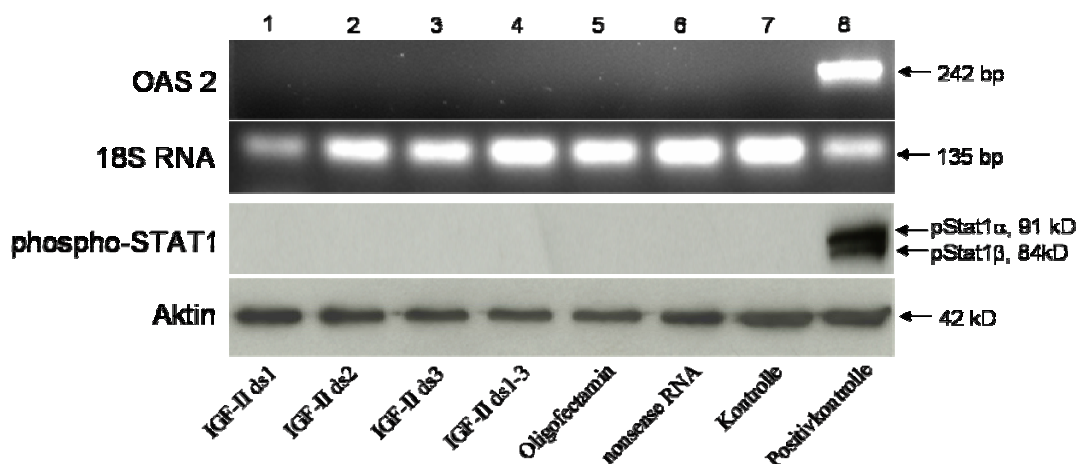
**Abbildung 18: IGF-II mRNA Konzentration nach Transfektion dreier IGF-II spezifischer siRNAs**

Vier Tage nach der transienten Transfektion genspezifischer siRNA wurde die IGF-II mRNA Konzentration in den Inhibierungen (helle Balken) und den Kontrollen (dunkle Balken) im TaqMan bestimmt. Sowohl in Huh-7-Zellen (Abb. A) wie auch in Hep3B (Abb. B) wurden die unbehandelten Kontrollzellen als Kalibrator gewählt.

Im Vergleich zu den Kontrollen konnte durch alle siRNAs und ihre Kombination eine deutliche Reduktion der IGF-II Expression erzielt werden. In beiden Zelllinien erbrachte siRNA IGF-II ds3 mit einer Reduktion um 86% (Huh-7, Abbildung 18A) bzw. 92% (Hep3B, Abbildung 18B) das beste Ergebnis. Durch die Kombination der verschiedenen siRNAs konnte keine Steigerung der IGF-II Reduktion erzielt werden (Reduktion in Huh-7: 84%, Reduktion in Hep3B: 91%).

### 3.3.2. Überprüfung einer unspezifischen Interferonantwort nach siRNA Transfektion

Wie zuvor bei der Rezeptorreduktion erläutert (3.2.3), wurden die Aktivität des Interferon-Signalmoleküls Stat1 anhand der Phosphorylierung und die Expression des Interferon-Zielgens OAS 2 untersucht. Auch im Fall der IGF-II spezifischen siRNA in Huh-7 und Hep3B zeigte die Überprüfung dieser Signalwegskomponenten, dass keine unspezifische Interferonantwort induziert wurde (für Huh-7 gezeigt in Abbildung 19).



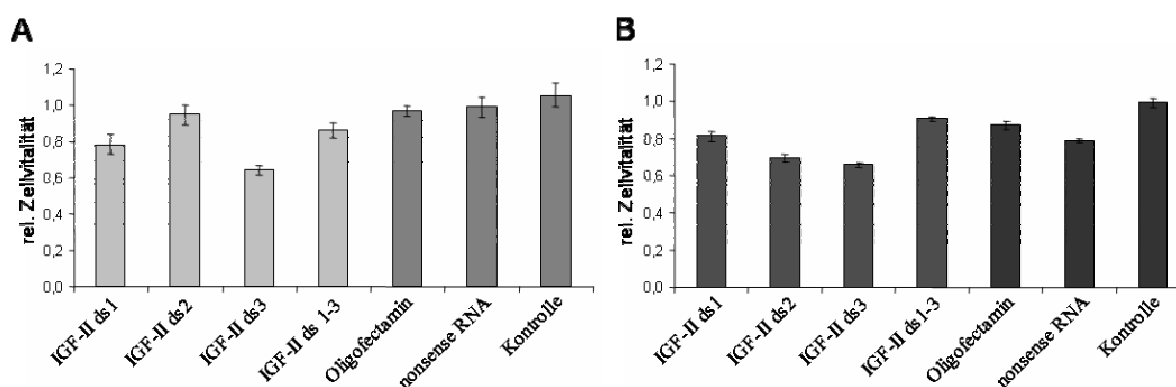
**Abbildung 19: Stat1 Aktivität und OAS-Expression nach siRNA Transfektion in Huh-7-Zellen**

Die Expression des IFN Zielgens OAS 2 (PCR-Analyse) und die Phosphorylierung der beiden Splicevarianten des Stat1 (Stat1α, 91 kD, Stat1β/Stat2, 84 kD, Western Blot) wurden vier Tage nach der Transfektion IGF-II spezifischer siRNA in Huh-7-Zellen analysiert. (Positivkontrolle: IFN

behandelte Zellen für Western Blot Analyse, RNA eines Tumors, in dem IFN-regulierte Gene verstärkt expremiert werden für die PCR).

### 3.3.3. Auswirkungen der IGF-II-Reduktion auf die HCC Zellvitalität

Nachdem die IGF-II-Inhibierung durch RNAi auf RNA Ebene bestätigt werden konnte, wurde die Veränderung der Zellvitalität der Huh-7- und Hep3B-Zellen mittels MTT-Test untersucht. Wie schon die Auswertung der mRNA Expression zeigte, haben die verschiedenen siRNA Sequenzen in den beiden Zelllinien keine identischen Effekte. Während in Huh-7 (Abbildung 20A) mit Ausnahme der IGF-II ds2 alle Behandlungen einen signifikanten Vitalitätsverlust bewirkten, konnte ein solcher in Hep3B-Zellen (Abbildung 20B) durch IGF-II ds2 und IGF-II ds3 erzielt werden.



**Abbildung 20: Einfluss der IGF-II Reduktion auf die Zellvitalität**

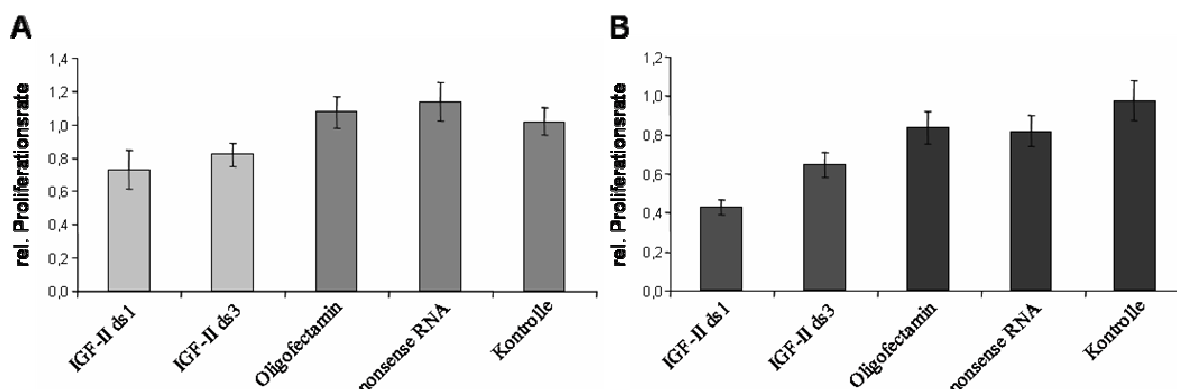
Der Zellvitalitätstest der Huh-7- (Abb. A) und Hep3B-Zellen (Abb. B) zeigt die relative Anzahl stoffwechselaktiver Zellen nach siRNA Transfektion (helle Balken) im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen (dunkle Balken) 5 Tage nach der Transfektion. Die dargestellten Balken sind Mittelwerte von 6 Proben mit der entsprechenden Standardabweichung.

Die maximale Vitalitätsreduktion rief in beiden Zelllinien siRNA IGF-II ds3 hervor (Huh-7 - 36%,  $p=1,23 \times 10^{-5}$  und Hep3B -34%,  $p=3,09 \times 10^{-9}$ ). Eine etwas schlechtere Effizienz hatten in Huh-7 IGF-II ds1 (Restvitalität 78%,  $p=0,0004$ ) und IGF-II ds1-3 (Restvitalität 86%,  $p=0,005$ ), während in Hep3B-Zellen durch die Transfektion der siRNA IGF-II ds2 eine Restvitalität von 69% ( $p=1,31 \times 10^{-5}$ ) erzeugt wurde. In Huh-7 wurde die Zellvitalität weder durch die Inkubation der Zellen mit dem Transfektionsreagenz (Restvitalität 95%) noch durch die Transfektion der nonsense siRNA (Restvitalität 97%) beeinträchtigt. In Hep3B-Zellen führte die Transfektion der nonsense siRNA mit einer Reduktion um 21% zu einem Vitalitätsverlust, der zum Teil durch die Auswirkungen des Oligofectamins erklärt werden kann (Vitalitätsreduktion um 13%). Aufgrund der unspezifischen Vitalitätsreduktion durch nonsense siRNA wurde für die statistische Signifikanzberechnung die Vitalität der nonsense siRNA transfizierten Zellen als Vergleichswert gewählt.

Da der MTT-Test keine Unterscheidung zwischen Proliferation und Apoptose als Ursache für den Vitalitätsverlust ermöglicht, wurden weitere funktionelle Analysen durchgeführt. Da unter Berücksichtigung der bisher durchgeführten Analysen in beiden Zelllinien die Sequenz IGF-II ds3 die besten Ergebnisse erzielte, wurde diese Sequenz für die weiteren Analysen eingesetzt. Außerdem wurde IGF-II ds1 verwendet, da diese in den Huh-7-Zellen eine signifikante Vitalitätsreduktion herbeiführte und in Hep3B auf mRNA Ebene eine effiziente IGF-II Reduktion zeigte.

### 3.3.4. Einfluss der IGF-II Reduktion auf die Proliferation

Durch den Einbau des Brom-markierten UTPs als Basenanalogen in die DNA proliferierender Zellen kann mittels des BrdU-ELISA die relative Proliferationsrate bestimmt werden. In den Huh-7-Zellen zeigte sich, dass IGF-II ds1 (-27%,  $p < 0,001$ ) wie auch IGF-II ds3 (-18%,  $p < 0,001$ ) zu einer signifikanten Reduktion der Proliferation führten (Abbildung 21A). Auch in Hep3B-Zellen, in denen ebenfalls eine signifikante IGF-II mRNA Reduktion und eine Verringerung der Vitalität nachgewiesen wurde, konnte durch die Transfektion der IGF-II siRNA eine signifikante Proliferationsreduktion im Vergleich zu den Kontrollen (nonsense RNA und Oligofectamin) erzeugt werden (IGF-II ds1 -55%,  $p < 0,0007$ ; IGF-II ds3 -33%,  $p < 0,008$  Abbildung 21B).



**Abbildung 21: Zellproliferation nach Reduktion der IGF-II-Expression**

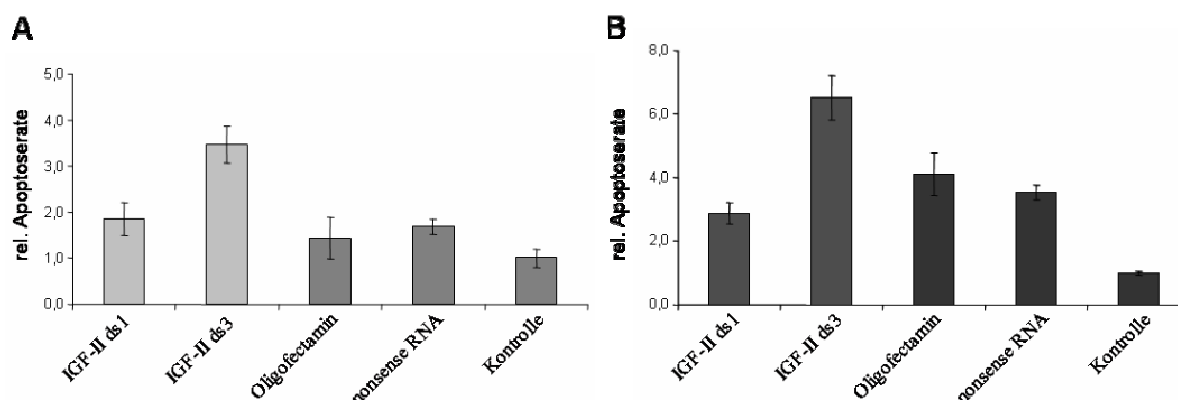
Drei Tage nach der transienten Transfektion genspezifischer siRNA wurde die relative Wachstumsrate der Inhibierungen (helle Balken) im Vergleich zu den Kontrollen (dunkle Balken) ermittelt. (Abb. A: Huh-7-Zellen; Abb. B: Hep3B-Zellen; Kalibrator: unbehandelte Zellen „Kontrolle“)

Da die nachgewiesene Proliferationsreduktion nicht ausschließlich für den Vitalitätsverlust der Tumorzellen verantwortlich sein muss, wurde auch die Apoptoserate der Zellen nach IGF-II Reduktion analysiert.

### 3.3.5. Beeinflussung der Tumorzell-Apoptose nach Reduktion der IGF-II-Expression

Durch die FACS-Analyse sollte überprüft werden, ob außer der Proliferation auch die Apoptoserate durch die Transfektion der IGF-II spezifischen siRNA beeinflusst wurde.

Die transiente Transfektion der siRNA IGF-II ds3 führte in Huh-7 im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen zu einer 3,5-fachen Erhöhung der Apoptoserate ( $p=3,5 \times 10^{-5}$ ) und auch im Vergleich zur mit nonsense siRNA transfizierten Kontrolle lag ein signifikant erhöhter Wert vor ( $p=0,000017$ ) (Abbildung 22A). In Hep3B-Zellen wurde der basale Apoptosewert sogar um das 6,5-fache gesteigert ( $p=0,005$ ) und auch bezogen auf den ebenfalls erhöhten Apoptosewert der nonsense Kontrolle verursachte die Transfektion der siRNA IGF-II ds3 eine signifikante Zunahme der Apoptose ( $p=0,011$ ) (Abbildung 22B). Die Transfektion der IGF-II ds1 hatte allerdings keinen messbaren Einfluss auf die Induktion der Apoptose in beiden Zelllinien (verglichen mit Kontrollen Oligofectamin und nonsense RNA).



**Abbildung 22: Zusammenfassende Darstellung der FACS-Analysen nach IGF-II-Reduktion in Huh-7- und Hep3B-Zellen**

Die relative Apoptoserate der mit genspezifischer siRNA transfizierten Huh-7- (Abb. A) und Hep3B-Zellen (Abb. B) (helle Balken) wurde mit den apoptotischen Ereignissen in den Kontrollbehandlungen (dunkle Balken) verglichen. Die hier gezeigten Ergebnisse sind die Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten.

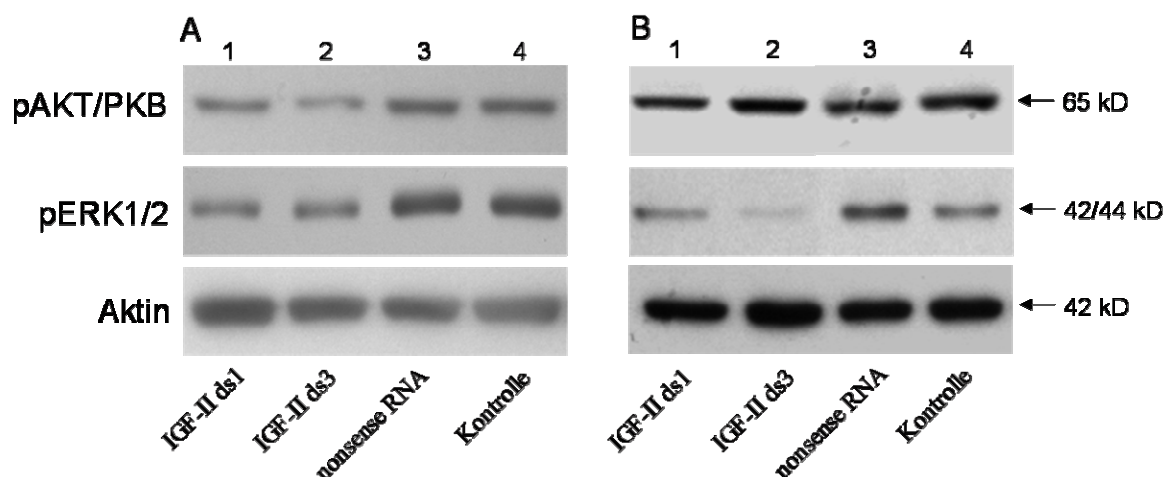
Sowohl die Analyse der Apoptose wie auch die Untersuchung der Vitalität und der Proliferation zeigten mit der Transfektion der IGF-II spezifischen siRNA assoziierte Effekte.

### 3.3.6. Effekte der IGF-II-Reduktion auf den Phosphorylierungsstatus von Signalmolekülen

Um bestimmen zu können, inwiefern sich die Reduktion des Liganden IGF-II nicht nur auf funktioneller Ebene auswirkt, sondern welche Effektorkinasen in ihrer Aktivität beeinflusst werden, wurden Western Blot Analysen mit phospho-spezifischen Antikörpern gegen typische zytoplasmatische Signalmoleküle durchgeführt.

Die Effekte der IGF-II Inhibierung, die sich im Phosphorylierungsstatus der Kinasen AKT/PKB und ERK zeigten, unterschieden sich in beiden Zelllinien. In Huh-7 führten beide siRNAs (ds1, ds3) zu einer verminderten Phosphorylierung der Kinasen (Abbildung 23A). Während die ERK1/2 Phosphorylierung durch die verschiedenen IGF-II siRNA Sequenzen ähnlich stark verringert wurde, ist die Auswirkung der IGF-II ds3 siRNA auf die Proteinkinase B (AKT/PKB) stärker als die der IGF-II ds1 siRNA. In Hep3B-Zellen

(Abbildung 23B) wird die Phosphorylierung der AKT/PKB Kinase nur leicht durch IGF-II ds1 reduziert, IGF-II ds3 konnte keine Veränderung bewirken. Im Gegensatz dazu bewirkte diese siRNA-Sequenz die nahezu vollständige Dephosphorylierung der ERK1/2 Kinase, bei der auch eine deutliche Phosphorylierungsreduktion durch IGF-II ds1 beobachtet werden konnte.



**Abbildung 23: Phosphorylierungszustand der Signalproteine AKT/PKB und ERK1/2**

Vier Tage nach der Transfektion der genspezifischen siRNA in Huh-7- (Abb. A) und Hep3B-Zellen (Abb. B) wurden die Proteinextrakte im Western Blot auf den Phosphorylierungsstatus von AKT/PKB und ERK1/2 im Vergleich zu nonsense siRNA transfizierten und unbehandelten Zellen untersucht.

Die Effekte auf den nachfolgenden Signalweg durch die Inhibierung des Liganden erscheinen stärker als durch die Reduktion eines einzelnen Rezeptors. Um jedoch eine wirkliche Aussage treffen zu können, war es notwendig, die Auswirkungen nochmals in direktem Vergleich zu betrachten.

### 3.4. Vergleichende Analysen – Ligand gegen Rezeptorreduktion

Zunächst erfolgte erneut eine detaillierte Analyse, um die Ursache der verminderten Zellvitalität zu bestimmen. Hierfür wurden die Beeinflussung der Apoptose und der Proliferation durch RNAi vergleichend untersucht. Anschließend wurden der Phosphorylierungsstatus verschiedener Signalmoleküle hinsichtlich ihrer Aktivität analysiert.

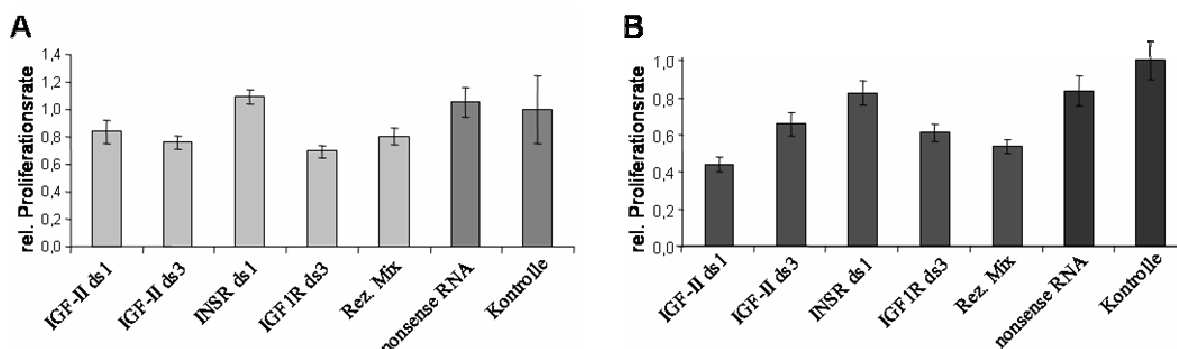
#### 3.4.1. Einfluss der Rezeptor und der Ligandenreduktion auf die Proliferation

Sowohl in Huh-7- (Abbildung 24A) wie auch in Hep3B-Zellen (Abbildung 24B) zeigte die Reduktion des INSR keinen signifikanten Einfluss auf das Wachstumsverhalten. Während die Proliferationsrate in Huh-7 im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen nicht verändert war, lag der Wert in Hep3B-Zellen mit einer relativen Proliferationsrate von 83% im Bereich der mit dem Transfektionsreagenz behandelten Kontrollzellen (rel. Proliferationsrate 85%,

Daten nicht gezeigt). Im Gegensatz dazu führte sowohl die Reduktion des Liganden IGF-II wie auch die IGF1R-Inhibierung bzw. die kombinierte Inhibierung des IGF1R und des INSR zu einer signifikanten Proliferationsreduktion.

In Huh-7-Zellen wurde die geringste Proliferation in IGF1R siRNA transfizierten Zellen nachgewiesen (69%,  $p < 0,008$ ), die gleichzeitige Reduktion beider Rezeptoren verminderte das Wachstum um 20% ( $p < 0,04$ ). Die verringerte Bioverfügbarkeit des Liganden führte zu einer relativen Proliferationsrate von 84% (IGF-II ds1,  $p < 0,05$ ) bzw. 76% (IGF-II ds3,  $p < 0,02$ ).

In Hep3B-Zellen wurde die geringste Proliferation nach Transfektion der siRNA IGF-II ds1 gemessen (-56%,  $p < 0,0007$ ), IGF-II ds3 reduzierte die Wachstumsrate um 34% ( $p < 0,01$ ). Die Reduktion des IGF1R war mit einer Hemmung von 39% ( $p < 0,003$ ) nicht so effektiv wie die gleichzeitige Reduktion beider Rezeptoren (-46%,  $p < 0,002$ ).



**Abbildung 24: Proliferationsrate nach Rezeptor und Liganden-Reduktion durch siRNA Transfektion**

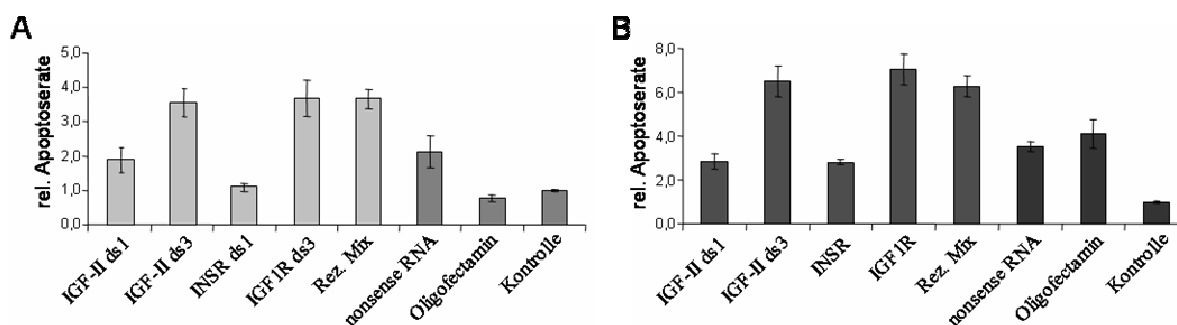
Am Tag nach der siRNA Transfektion wurde die relative Proliferation in den Inhibierungen (helle Balken) im Vergleich zu den Kontrollen (dunkle Balken) durch den Einbau des BrdU in die DNA proliferierender Zellen im BrdU-ELISA bestimmt. (Abb. A: Huh-7-Zellen; Abb. B: Hep3B-Zellen; Kalibrator: unbehandelte Zellen „Kontrolle“).

### 3.4.2. Beeinflussung der Tumorzell-Apoptose

Auch die Apoptoserate der beiden Zelllinien konnte nicht maßgeblich durch die siRNA-Inhibierung des INSR beeinflusst werden. Wie auch bei der Proliferationsanalyse zeigten sich in Huh-7-Zellen (Abbildung 25A) nur geringfügige Veränderungen gegenüber den unbehandelten Zellen (rel. Apoptoserate 1,08). In Hep3B-Zellen (Abbildung 25B) lag der Wert nach Transfektion der INSR siRNA ds1 mit einer Induktion von 2,82 im Vergleich zu unbehandelten Zellen noch unter der Apoptoserate der Oligofectamin- und nonsense RNA-Kontrollen. Diese Veränderung des Apoptosewertes ist also auf die Behandlung der Zellen mit dem Transfektionsreagenz zurückzuführen und keine Reaktion auf die genspezifische siRNA.



Einen spezifischen Anstieg im Vergleich zu allen Kontrollen verursachte die Reduktion des IGF1R bzw. beider Rezeptoren. In Huh-7-Zellen wurde nach beiden Behandlungen das 3,6-fache des basalen Apoptosewertes gemessen ( $p < 0,01$ ), in Hep3B-Zellen stieg die Apoptose auf das 7-fache (IGF1R ds3,  $p < 0,008$ ) und bei gleichzeitiger Inhibierung beider Rezeptoren wurde die 6,3-fache Menge apoptotischer Zellen gemessen ( $p < 0,003$ ). Die Inhibierung des Liganden hatte in beiden Zelllinien mit der IGF1R Inhibierung vergleichbar starke Effekte. Während in Huh-7-Zellen durch die siRNA IGF-II ds3 ein Anstieg auf das 3,5-fache hervorgerufen wurde ( $p < 0,001$ ), bewirkte diese siRNA in Hep3B-Zellen einen Anstieg auf das 6,5-fache des Ausgangswertes ( $p < 0,02$ ). Damit induzierte die siRNA IGF-II ds3 ebenso viel Apoptose wie der Verlust des IGF1R, während IGF-II ds1 mit der Veränderung um den Faktor 1,8 (Huh-7) bzw. 2,9 (Hep3B) im Vergleich zur nonsense RNA Kontrolle keine signifikante Induktion der Apoptose hervorrief.



**Abbildung 25: Zusammenfassende Darstellung der FACS-Analyse nach siRNA Transfektion**

Vier Tage nach der Transfektion der Liganden- und Rezeptor-spezifischen siRNA wurde die Apoptoserate in Huh-7-Zellen (Abb. A) und Hep3B-Zellen (Abb. B) bestimmt. Die hier dargestellten relativen Apoptoseraten der Inhibierungen (helle Balken) und der Kontrollen (dunkle Balken) sind die Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten.

### 3.4.3. Effekte der Rezeptor und der Ligandenreduktion auf den Phosphorylierungsstatus von Signalmolekülen

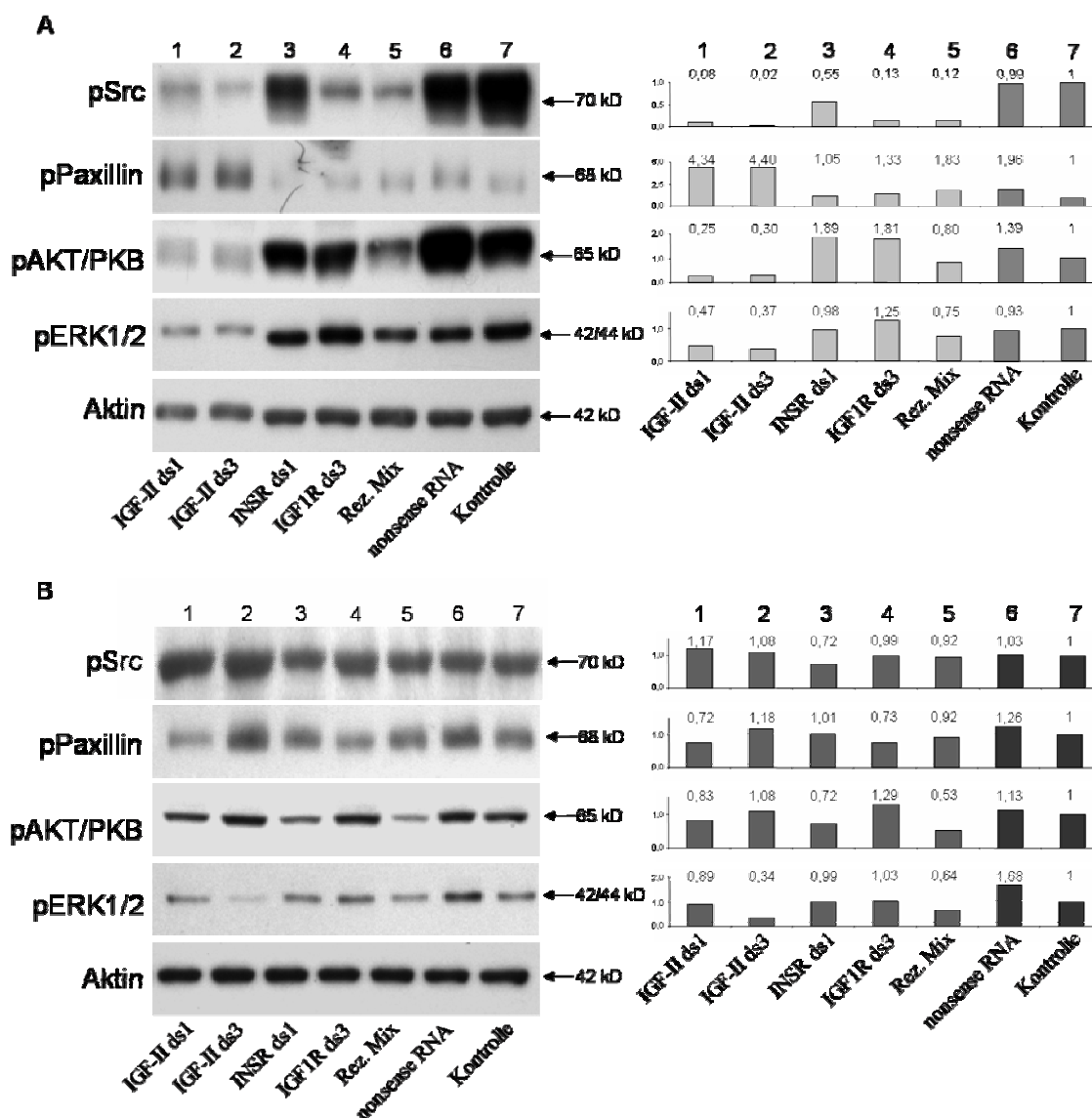
Die Signale der Western Blots mit den phosphosensitiven Antikörpern zur Bestimmung des Phosphorylierungsstatus der Downstream-Effektoren, der Rückschlüsse auf die Aktivität ermöglicht, wurden zu leichterem Interpretation densitometrisch quantifiziert. Diese Form der Auswertung ermöglicht keine Aussage über die absolute Quantität des jeweiligen Phosphoproteins im Vergleich zur Kontrolle, jedoch geben die Werte einen Eindruck der erfolgten relativen Regulation. Die Messwerte sind also keine Mengenangaben sondern verdeutlichen die Tendenz der Effektor-Aktivität nach genspezifischer siRNA-Transfektion.

Im Gegensatz zu den funktionell orientierten Proliferations- und Apoptoseanalysen ergaben sich bei der Untersuchung der Downstream-Effektoren in Huh-7 (Abbildung 26A, links im Western Blot, rechts die densitometrische Auswertung der Bandenintensität) die deutlichsten



Effekte durch Ligandeninhibierung (Abbildung 26A, Spur 1 und 2). Die Auswirkung auf die Kinasen ERK und AKT/PKB war durch beide IGF-II-spezifischen Sequenzen etwa gleich, während die Phosphorylierung von Src am geringsten nach Inkubation mit siRNA IGF-II ds3 war. Die Phosphorylierung des Signalmoleküls Paxillin (Pax) nimmt durch aktives IGF1R-*„Signalling“* ab. In diesem Fall ist also eine Zunahme der Phosphorylierung ein Zeichen für eine abgeschwächte Signaltransduktion. Die Western Blot Analyse zeigt, dass nur die IGF-II-Reduktion zu einer mehr als 4 mal so starken Phosphorylierung des Paxillins führte, ein leichter Anstieg wurde auch durch die gleichzeitige Reduktion beider Rezeptoren verursacht (Spur 5), ebenso zeigt die mit nonsense siRNA transfizierte Kontrolle eine leichte Zunahme der Phosphorylierung (Spur 6). Auch bei der Kinase ERK zeigte die Doppelinhibierung einen leichten Aktivitätsrückgang in Form verminderter Phosphorylierung. AKT/PKB wurde leicht durch die alleinige Reduktion beider Rezeptoren beeinflusst (Spur 3 und 4) und obwohl die gleichzeitige Inhibierung stärkere Effekte aufwies, wurde nicht das Phosphorylierungsniveau erreicht, was durch die IGF-II-Inhibierung erzielt werden konnte. Bei der Src-Kinase führte schon die Reduktion des INSR (Spur 3) zu einer leicht reduzierten Phosphorylierung, die Reduktion des IGF1R (Spur 4) und die kombinierte Inhibierung beider Rezeptoren (Spur 5) zeigte ein so abgeschwächtes *„Signalling“*, wie es auch durch die IGF-II ds1 siRNA hervorgerufen wurde.

In den Hep3B-Zellen stellte sich der Phosphorylierungszustand der Kinasen nach der Transfektion anders dar (Abbildung 26B, links im Western Blot, rechts die densitometrische Auswertung der Bandenintensität). Während die Src-Kinase einen leichten Rückgang der Phosphorylierung nach der INSR-Reduktion (Spur 3) und der gleichzeitigen Inhibierung beider Rezeptoren (Spur 5) zeigte, wurde AKT/PKB zusätzlich auch durch die Transfektion der IGF-II ds1 siRNA (Spur 1) in ihrer Phosphorylierung reduziert. Eine Schwächung der ERK Signaltransduktion wurde hauptsächlich durch siRNA IGF-II ds3 (Spur 2) erreicht, ferner zeigte die gleichzeitige Reduktion beider Rezeptoren eine leichte Abnahme der Signalintensität. Da bei Pax der dephosphorylierte Zustand durch aktives IGF *„Signalling“* verursacht wird, scheint der Phosphorylierungszustand dieses Molekül in den Hep3B-Zellen gänzlich anders als in Huh-7 reguliert zu sein. Ein maximales Maß an Phosphorylierung konnte in IGF-II ds3 und nonsense siRNA transfizierten Zellen nachgewiesen werden, die schwächste Phosphorylierung zeigten die IGF-II ds1 und IGF1R ds3 transfizierten Zellen.



**Abbildung 26: Aktivität verschiedener mit der IGF-Achse assoziierter Kinasen nach siRNA Transfektion**

Vier Tage nach der Transfektion der Liganden- und Rezeptor-spezifischen siRNA in Huh-7 (Abb. A) und Hep3B-Zellen (Abb. B) wurden die Proteinextrakte auf den Phosphorylierungsstatus verschiedener Signalmoleküle überprüft (Western Blot in der linken Hälfte). Zur besseren Vergleichbarkeit der Downstream-Effektor-Aktivität in den verschiedenen Inhibierungen (Spur 1-5) mit den Kontrollen (Spur 6 und 7), wurden die einzelnen Bandenintensitäten densitometrisch bestimmt (Säulendiagramm in der rechten Hälfte). Während die Kinasen Src, ERK1/2 und AKT/PKB durch die IGF-II-induzierte Signalkaskade phosphoryliert werden, kommt es bei Paxillin zu einer Dephosphorylierung.

Die Auswirkungen der IGF-II-Inhibierung auf die verschiedenen Downstream-Effektoren war in Huh-7-Zellen deutlicher als in Hep3B-Zellen. Die Rezeptorinhibierung durch die transiente siRNA Transfektion zeigte in Hep3B-Zellen mit Ausnahme der AKT/PKB Dephosphorylierung nach Reduktion beider Rezeptoren gemessen am Phosphorylierungszustand der Kinasen keine signifikante Änderung ihrer Aktivität.

### 3.5. Array-Analysen

#### 3.5.1. Generierung der Rohdaten

Um die Auswirkungen der verschiedenen genspezifischen siRNA Inhibierungen auf Expressionsebene untersuchen zu können, wurden ‚*Gene Chip*<sup>®</sup>*Expression Arrays*‘ durchgeführt. So sollten gemeinsam und differentiell regulierte Gene der Liganden- und Rezeptorreduktion identifiziert werden, um mögliche mechanistische Erklärungen für die unterschiedlichen Effekte auf funktioneller Ebene zu finden.

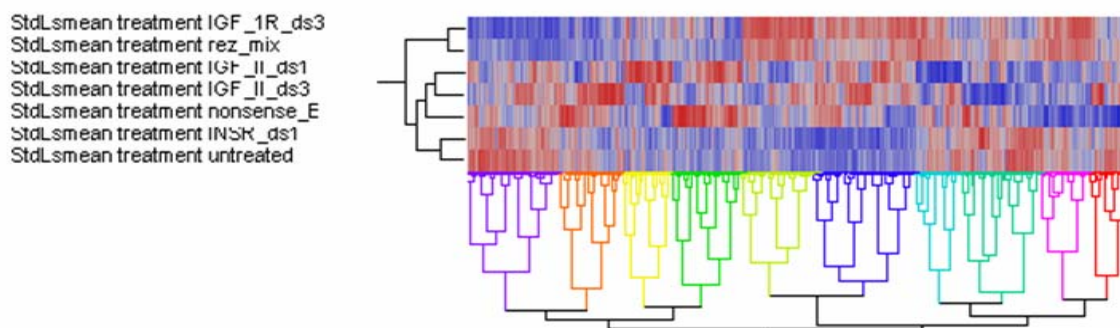
Für die Expressionsanalysen wurden Huh-7-Zellen nach dem etablierten Protokoll jeweils mit IGF-II siRNA ds1 und ds3, INSR siRNA ds1, IGF1R siRNA ds3, dem Mix der Rezeptor siRNAs und der nonsense siRNA in zwei unabhängigen Experimenten transfiziert. Die RNA Extraktion erfolgte nach dem Standardprotokoll. Neben der photometrischen Konzentrationsbestimmung wurde die RNA mittels der AGILENT Technologie hinsichtlich ihrer Integrität analysiert. Hier konnte für alle Proben eine optimale Qualität der RNA (RIN >9) bestätigt werden (2.2.2.3). Die effiziente siRNA-vermittelte, genspezifische Reduktion der verschiedenen Zielgene wurde nach cDNA-Synthese in der semiquantitativen ‚*realtime*‘ PCR überprüft (Daten nicht gezeigt). Anschließend wurden diese RNA-Fraktionen für die nachfolgende Expressionsanalyse eingesetzt.

Nach cDNA Synthese, *in-vitro* Transkription und Fluoreszenzmarkierung wurden die Proben auf je einem ‚*Human Genom U133A 2.0 Array*‘ hybridisiert. Nach der Signaldetektion erfolgte die Auswertung der Daten mit der SAS Microarray 1.3 Software (2.2.5.2). Insgesamt wurden 3714 Gene durch die verschiedenen Transfektionen aller Experimente höchst signifikant ( $p < 0,001$ ) reguliert. Neben den statistischen Parametern werden im Rahmen der Analyse zahlreiche für die Bioinformatik relevante Informationen (z.B. Anzahl der Proben je Probensatz, durchschnittliche Fluoreszenzintensität der Gene je Versuchsbedingung, Ausmaß der Regulation) erfasst.

#### 3.5.2. Ermittlung signifikant und biologisch relevant regulierter Gene

Unter Berücksichtigung der verschiedenen Expressionsdaten wurde ein Dendrogramm erstellt. Mit Hilfe dieser graphischen Darstellung wird die Ähnlichkeit von Expressionsprofilen unterschiedlicher Versuchsbedingungen durch ihre Anordnung und die farbliche Markierung der Datensätze verdeutlicht. Das Dendrogramm zeigt, dass die Reduktion des IGF1R zu einem ähnlichen Expressionsmuster wie die kombinierte Reduktion beider Rezeptoren führte. Die Expressionsmuster der beiden IGF-II siRNAs gleichen sich ebenfalls und sind nebeneinander angeordnet. Interessanterweise bewirkte die Transfektion der nonsense siRNA ebenfalls deutliche Effekte auf Expressionsebene. Die Reduktion des

Insulinrezeptors führte zu einem Expressionsmuster, dass die größte Ähnlichkeit zum Expressionsprofil der unbehandelten Zellen aufweist und steht daher in direkter Nachbarschaft zu den Kontrollzellen.



**Abbildung 27: Dendrogramm der Arra-Analysen**

Graphische Darstellung der Array-Analysen, bei der eine Anordnung aufgrund der Ähnlichkeit der Expressionsprofile nach den verschiedenen Behandlungen vorgenommen wird. Schwach exprimierte Gene sind blau markiert, stark exprimierte Gene rot. Ähnlich regulierte Gene stellt die Software, ohne funktionelle Zusammenhänge zu berücksichtigen, farblich markiert da.

Um Aussagen über die spezifische Veränderungen der Expression treffen zu können, wurden alle 3714 regulierten Gene den ursächlichen Transfektionsbedingungen (IGF-II-, INSR-, IGF1R-Reduktion, gleichzeitige Reduktion beider Rezeptoren und Transfektion der nonsense siRNA) zugeordnet (Tabelle 3, Spalte 1). Bei der Genexpression nach IGF-II-spezifischer siRNA Transfektion wurden nur die Gene berücksichtigt, die durch beide siRNA-Sequenzen signifikant reguliert waren (IGF-II siRNA ds1 und ds3). Nachfolgende Analysen wurden mit dieser nur ‚IGF-II‘ benannten Schnittmenge durchgeführt und alle weiteren Kriterien mussten stets durch beide siRNA Sequenzen erfüllt werden. In der tabellarischen Zusammenfassung der Expressionswerte werden allerdings beide Versuchsbedingungen getrennt aufgeführt (siehe Anhang).

Aus den so entstandenen Gengruppen wurden zunächst die signifikant regulierten Gene herausgefiltert, die nicht mindestens um den Faktor 1,5 reguliert vorlagen (Tabelle 3, Spalte 2). Um die unspezifischen Effekte der siRNA Transfektion von den durch die genspezifische siRNA erzeugten Effekte zu diskriminieren, wurden alle Gene, welche durch die nonsense siRNA signifikant um den Faktor 1,5 reguliert wurden, aus den Gengruppen ausgeschlossen (Tabelle 3, Spalte 3).

Versuchsbedingungen	Anzahl signifikant regulierter Gene	Anzahl signifikant und biologisch relevant regulierter Gene	Anzahl signifikant und biol. relevant regulierter Gene, jedoch nicht durch nonsense siRNA reguliert
IGF1R-Inhibierung	2357	682	534 (Anhang Tabelle A)
INSR- Inhibierung	377	16	9 (Anhang Tabelle B)
Inhibierung beider Rezeptoren	1875	342	244 (Anhang Tabelle C)
IGF-II- Inhibierung	1093	188	104 (Anhang Tabelle D)
nonsense siRNA Transfektion	1868	404 (Anhang Tabelle E)	--

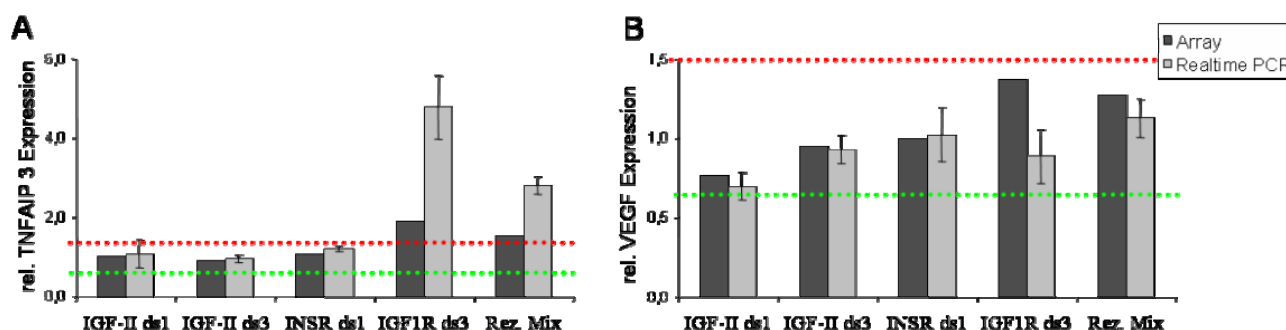
**Tabelle 3: Anzahl der Gene, die nach siRNA-Transfektion reguliert vorlagen**

Die Anzahl der signifikant regulierten Gene beinhaltet die Gene, die im Vergleich zu unbehandelten Zellen signifikant ( $<0,001$ ) verändert exprimiert wurden. Die signifikant und biologisch relevant regulierten Gene waren darüber hinaus mindestens um den Faktor 1,5 im Vergleich zu den unbehandelten Zellen reguliert. Um die unspezifischen Effekte der siRNA-Transfektion bei der weiteren Analyse auszuschließen, wurden alle Gene, die durch die nonsense siRNA signifikant und biologisch relevant beeinflusst wurden, aus der Gruppe der nach genspezifischer siRNA-Transfektion differentiell exprimierten Genen herausgenommen.

Infolge der Transfektion der nonsense siRNA wurden 404 Gene nach den Kriterien der Signifikanz und biologischen Relevanz verändert exprimiert. Durch die beiden IGF-II siRNA Sequenzen wurden 188 Gene signifikant und biologisch relevant reguliert, wobei 84 dieser Gene auch durch die nonsense siRNA reguliert vorlagen; 104 Gene wurden also spezifisch nach IGF-II-Reduktion verändert exprimiert. Bei 66 Genen lag eine Induktion der Expression vor, 38 Gene wurden reduziert exprimiert. Nach der Reduktion des INSR erfüllte nur die Expression von 16 Genen die Kriterien der biologischen Relevanz und der Signifikanz. Neun Gene aus dieser Gruppe wurden nicht auch durch nonsense siRNA Transfektion beeinträchtigt, sondern aufgrund der INSR-Inhibierung vermindert exprimiert. Nach der Transfektion der IGF1R ds3 siRNA zeigten 682 Gene eine signifikant und biologisch relevant veränderte Expression im Vergleich zu den Kontrollzellen. Da 148 dieser Gene auch nach der nonsense siRNA Transfektion eine veränderte Expression aufwiesen, konnten 534 Gene als Folge der IGF1R-Reduktion angesehen werden. Bei 259 Genen konnte eine verstärkte Expression nachgewiesen werden, die anderen 275 Transkripte lagen im Vergleich zu den Kontrollzellen in geringerer Konzentration vor. Der gleichzeitige Verlust beider Rezeptoren führte zu einer veränderten Expression bei 342 Genen, von denen 98 auch in der Gruppe der durch nonsense siRNA signifikant und biologisch relevant regulierten Gene zu finden waren. So konnte die modifizierte Expression von 244 Genen (124 induziert, 120 reduziert) auf den Verlust der beiden Rezeptoren zurückgeführt werden.

### 3.5.3. Validierung der Array-Expressionsdaten mittels ‚realtime‘ PCR

Um die in der Array-Analyse erhaltenen Expressionswerte zu verifizieren, wurde die mRNA-Konzentration zweier Gene, VEGF (*vascular endothelial growth factor*) und TNFAIP3 (*tumor necrosis factor alpha induced protein 3*), repräsentativ in der ‚realtime‘ PCR überprüft. Während die TNFAIP3-Expression laut der Array-Analyse durch die Transfektion der genspezifischen siRNAs induziert vorlag, wurde VEGF nicht biologisch relevant reguliert. Zur Bestätigung der Expressionswerte wurde eine semiquantitative ‚realtime‘ PCR durchgeführt und die Expression der Gene nach Transfektion genspezifischer siRNA wurde wie bei der Auswertung der Array-Daten mit der Expression in unbehandelten Zellen verglichen (Abbildung 28).



**Abbildung 28: Validierung der mRNA Expressionswerte aus der Array-Analyse mittels ‚realtime‘ PCR**

Die relative mRNA Expression von TNFAIP3 (Abb. A) und VEGF (Abb. B) aus der Array-Analyse (dunkle Balken) wurde durch eine semiquantitative PCR (helle Balken) überprüft. Die Expressionswerte wurden gegen die Expression unbehandelter Zellen verglichen. Die Schwelle der  $\pm 1,5$ -fachen Regulation ist in den Diagrammen als rote (Induktion) und grüne (Reduktion) Linie eingezeichnet.

Die Werte aus der Array-Analyse konnten bestätigt werden. Die TNFAIP3 Expression wurde sowohl durch die IGF1R-Inhibierung wie auch durch die gleichzeitige Inhibierung beider Rezeptoren induziert. Die anderen siRNAs führten zu keiner veränderten Expression dieses Gens. VEGF zeigte im Array durch keine der siRNA-Inhibierungen eine Regulation, was durch die ‚realtime‘ PCR bestätigt wurde.











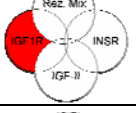


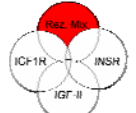
### 3.5.4. Schnittmengenanalyse der Gene, die exklusiv oder gemeinsam nach genspezifischer RNAi modifiziert werden

Nachdem die Expressionwerte der Array-Analyse repräsentativ an zwei Genen verifiziert werden konnte, wurden weitere Auswertungen vorgenommen. Um die Unterschiede zwischen den einzelnen siRNA Inhibierungen eingrenzen zu können, wurden Schnittmengenanalysen mit den Gengruppen, die signifikant und biologisch relevant reguliert aber in ihrer Expression nicht durch die nonsense siRNA modifiziert vorlagen, durchgeführt (Tabelle 4). Es wurden die Gene und funktionellen Prozesse gesucht, die gemeinsam durch die IGF-II-Reduktion und

die IGF1R-Reduktion, die IGF-II-Reduktion und die INSR-Reduktion wie auch durch die IGF-II-Reduktion und die gleichzeitige Reduktion beider Rezeptoren reguliert wurden. Ferner wurden die Schnittmengen der verschiedenen Rezeptorreduktionen, also IGF1R- und INSR-Reduktion, IGF1R- und kombinierte Rezeptorreduktion und INSR- und kombinierte Rezeptorreduktion ermittelt. Außer der Identifikation der gemeinsam regulierten Komponenten wurden die Gene und Funktionsgruppen gesucht, die ausschließlich durch die einzelnen siRNA Inhibierungen beeinflusst wurden, also spezifische Zielgene von IGF-II, IGF1R, INSR und der kombinierten Rezeptorreduktion.

Von den 534 Genen, die nach der Transfektion des IGF1R siRNA ds3 im Vergleich zu unbehandelten Zellen differentiell exprimiert wurden, waren 274 spezifisch nach IGF1R-Reduktion reguliert. Ein Gen wurde gleichzeitig durch die INSR siRNA-Inhibierung beeinflusst, 232 waren auch durch die gleichzeitige Reduktion beider Rezeptoren verändert und 64 Gene wurden gemeinsam durch die IGF1R-Reduktion und die IGF-II-Reduktion in ihrer Expression verändert. Von den neun Genen, die nach der Reduktion des INSR ein anderes Expressionsprofil zeigen, werden acht Gene ausschließlich durch die INSR siRNA ds1 reguliert. Die Expression eines Gens wird außerdem durch die Reduktion beider Rezeptoren bzw. durch die Reduktion des IGF1R verändert. Zwischen den durch IGF-II-Reduktion und den durch INSR-Reduktion beeinflussten Genen gibt es keine Überschneidung. Zehn der insgesamt 244 durch den gleichzeitigen Verlust beider Rezeptoren in ihrer Expression modifizierten Gene sind spezifisch für die kombinierte Rezeptorreduktion. Gemeinsam durch die Reduktion des IGF-II und die Reduktion beider Rezeptoren werden 36 Gene reguliert. Von den 104 sowohl durch die Transfektion der IGF-II siRNA ds1 wie auch der IGF-II siRNA ds3 signifikant und biologisch relevant regulierten Genen sind 40 spezifisch durch Liganden-Reduktion modifiziert. Insgesamt 64 Gene werden außerdem durch die IGF1R-Reduktion reguliert, von denen 36 zusätzlich in der Gruppe der nach kombinierter Rezeptorreduktion veränderten Gene vorkommen.

Die ausführlichen Tabellen dieser vergleichenden Analysen befinden sich im Anhang.

Gengruppe		Anzahl der Gene	ausführlich im Anhang
	durch IGF1R-Inhibierung regulierte Gene	534	Tabelle A
	durch INSR-Inhibierung regulierte Gene	9	Tabelle B
	durch gleichzeitige Rezeptorinhibierung regulierte Gene	244	Tabelle C
	durch IGF-II-Inhibierung regulierte Gene	104	Tabelle D
	durch IGF1R- und AUCH durch IGF-II- Inhibierung regulierte Gene	64	Tabelle F
	durch INSR- und AUCH durch IGF-II- Inhibierung regulierte Gene	0	
	durch Rez. Mix- und AUCH durch IGF-II- Inhibierung regulierte Gene	36	Tabelle G
	durch IGF1R- und AUCH durch INSR- Inhibierung regulierte Gene	1	Tabelle H
	durch IGF1R- und AUCH durch Rez. Mix- Inhibierung regulierte Gene	232	Tabelle I
	durch Rez. Mix- und AUCH durch INSR- Inhibierung regulierte Gene	2	Tabelle J
	spezifisch durch IGF1R- Inhibierung regulierte Gene	274	Tabelle K
	spezifisch durch INSR- Inhibierung regulierte Gene	9	Tabelle L
	spezifisch durch IGF-II- Inhibierung regulierte Gene	40	Tabelle M
	spezifisch durch Rez. Mix- Inhibierung regulierte Gene	10	Tabelle N

**Tabelle 4: Einzelne signifikant und biologisch relevant regulierte Gengruppen und ihre Schnittmengen**



#### **3.5.4.1. Identifikation durch siRNA-Transfektion modifizierter zellulärer Prozesse**

Um die durch die RNA-Inhibierung induzierten Genexpressionen beurteilen und den verschiedenen Schnittmengen evtl. diskriminierende biologische Effekte zuordnen zu können, wurden zelluläre Prozesse (z.B. Zellzyklusregulation, DNA-Replikation) hinsichtlich der Regulation involvierter Gene untersucht. Sofern bekannt, war allen regulierten Genen mindestens ein biologischer Prozess (*Gene Ontology Biological Process*'), an dem es beteiligt ist, zugeordnet worden. Betrachtet man nun die Veränderung der Expression der Gene, die in einen bestimmten Ablauf involviert sind, können Rückschlüsse über die Auswirkung auf die Regulation des zellulären Prozesses gezogen werden. Einige dieser funktionellen Gruppen, die auffällig reguliert (z.B. Ubiquitinierung) oder grundsätzlich von Interesse (z.B. Apoptose) waren, sind in Tabelle 5 zusammengefasst. Ausführliche Tabellen der diesen Prozessen zugeordneten Genen und ihrer Regulation befinden sich im Anhang (Tabelle O). Die durch die Reduktion des Insulin-Rezeptors regulierten Gene gehören keiner der untersuchten Gruppen an.

Tabelle A

Gengruppe	DNA-Replikation			DNA-Repair			Metabolismus			Ubiquitinierung			Zellzyklus-regulation			Wachstum			Zelladhäsion			Protein-biosynthese			Signal-transduktion			Transkription			Apoptose		
	Σ	↓	↑	Σ	↓	↑	Σ	↓	↑	Σ	↓	↑	Σ	↓	↑	Σ	↓	↑	Σ	↓	↑	Σ	↓	↑	Σ	↓	↑	Σ	↓	↑			
IGF1R	8	7	1	5	4	1	10	10	0	7	0	7	16	7	9	5	0	5	12	3	9	14	9	5	17	2	15	42	7	35	2	0	2
MIX	3	3	0	3	2	1	4	4	0	3	0	3	11	5	6	3	0	3	4	0	4	4	4	0	7	0	7	18	3	15	--	--	--
IGF-II	1	0	1	--	--	--	--	--	--	1	0	1	3	0	3	2	0	2	5	0	5	--	--	--	4	1	3	3	2	1	1	0	1
spez. IGF1R	5	5	0	2	2	0	6	6	0	4	0	4	8	5	3	3	0	3	7	3	4	10	5	5	6	1	5	23	5	18	2	0	2
spez. Mix	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	2	2	0	1	0	1	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	
spez. IGF-II	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	1	0	1	--	--	--	--	--	--	--	--	--	1	1	0	2	2	0	1	0	1
IGF1R+IGF-II	1	0	1	--	--	--	--	--	--	1	0	1	2	0	2	2	0	2	5	0	5	--	--	--	1	0	1	1	0	1	--	--	--
MIX+IGF-II	--	--	--	--	--	--	--	--	--	1	0	1	2	0	2	2	0	2	2	0	2	--	--	--	1	0	1	1	0	1	--	--	--
MIX+IGF1R	3	3	0	3	2	1	4	4	0	3	0	3	8	2	6	2	0	2	4	0	4	4	4	0	4	0	4	18	3	15	--	--	--

Tabelle B

Gengruppe	DNA-Replikation			DNA-Repair			Metabolismus			Ubiquitinierung			Zellzyklus-regulation			Wachstum			Zelladhäsion			Protein-biosynthese			Signal-transduktion			Transkription			Apoptose		
	Σ	↓ [%]	↑ [%]	Σ	↓ [%]	↑ [%]	Σ	↓ [%]	↑ [%]	Σ	↓ [%]	↑ [%]	Σ	↓ [%]	↑ [%]	Σ	↓ [%]	↑ [%]	Σ	↓ [%]	↑ [%]	Σ	↓ [%]	↑ [%]	Σ	↓ [%]	↑ [%]	Σ	↓ [%]	↑ [%]	Σ	↓ [%]	↑ [%]
IGF1R	8	88	13	5	80	20	10	100	0	7	0	100	16	44	56	5	0	100	12	25	75	14	64	36	17	12	88	42	17	83	2	0	100
MIX	3	100	0	3	67	33	4	100	0	3	0	100	11	45	55	3	0	100	4	0	100	4	100	0	7	0	100	18	17	83	--	--	--
IGF-II	1	0	100	--	--	--	--	--	--	1	0	100	3	0	100	2	0	100	5	0	100	--	--	--	4	25	75	3	67	33	1	0	100
spez. IGF1R	5	100	0	2	100	0	6	100	0	4	0	100	8	63	38	3	0	100	7	43	57	10	50	50	6	17	83	23	22	78	2	0	100
spez. Mix	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	2	100	0	1	0	100	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
spez. IGF-II	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	1	0	100	--	--	--	--	--	--	--	--	--	1	100	0	2	100	0	1	0	100
IGF1R+IGF-II	1	0	100	--	--	--	--	--	--	1	0	100	2	0	100	2	0	100	5	0	100	--	--	--	1	0	100	1	0	100	--	--	--
MIX+IGF-II	--	--	--	--	--	--	--	--	--	1	0	100	2	0	100	2	0	100	2	0	100	--	--	--	1	0	100	1	0	100	--	--	--
MIX+IGF1R	3	100	0	3	67	33	4	100	0	3	0	100	8	25	75	2	0	100	4	0	100	4	100	0	4	0	100	18	17	83	--	--	--

**Tabelle 5: Funktionelle Gruppen und ihre Beeinflussung durch die siRNA-Transfektion**

Regulierte Gene werden verschiedenen zellulären Prozessen zugeordnet und so der Einfluß der RNA-Inhibierung auf die jeweiligen funktionellen Gruppen untersucht. In Tabelle A ist die Gesamtzahl (Σ) in hoch- (↑) und runter- (↓) regulierte Gene aufgetrennt. In Tabelle B sind die Gesamtzahl (Σ) und die prozentualen Anteile an Induktion (rot unterlegt) und Reduktion (grün unterlegt) dieser funktionellen Gruppe unter den entsprechenden Versuchsbedingungen angegeben.

Ausschließlich durch die IGF1R- und die kombinierte Rezeptorinhibierung reguliert wurden Gene, die mit der DNA-Reparatur und metabolischen Abläufen assoziiert sind. Während die Mehrheit der DNA-Reparaturgene in ihrer Expression reduziert wurde, einzige Ausnahme ist das Gen ATRX, wurden die in den Metabolismus involvierten Gene ohne Ausnahme runterreguliert. Ebenfalls nur durch die IGF1R- und die kombinierte Rezeptorreduktion reguliert wurden an der Proteinbiosynthese beteiligte Gene. Während nach der gleichzeitigen Reduktion beider Rezeptoren die mit der Proteinbiosynthese assoziierten Gene zu 100% in ihrer Expression reduziert wurden, sind nach der IGF1R-Inhibierung 36% überexprimiert. Alle fünf dieser überexprimierten Gene sind spezifisch durch die Transfektion der IGF1R siRNA modifiziert. Die wenigen regulierten Gene, denen direkt eine Rolle bei der Apoptose zugeordnet wurde, sind in ihrer Expression induziert. PPP1R15A (*protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 15A*) und PDCD6IP (*programmed cell death 6 interacting protein*) sind spezifisch nach der Reduktion des IGF1R, TNFAIP8 (*tumor necrosis factor, alpha-induced protein 8*) spezifisch nach der IGF-II-Reduktion verstärkt exprimiert. Ebenfalls ohne Ausnahme in ihrer mRNA Konzentration erhöht, sind sieben Gene, die an Ubiquitinierungsprozessen beteiligt sind, wobei nur RNF44 (*ring finger protein 44*) auch durch die Ligandenreduktion reguliert wird. Auch Gene, die mit Wachstums- und Proliferations-Prozessen assoziiert sind (z.B. IGFBP-1, IGFBP-2), sind zu 100% in ihrer Expression induziert. Aus der mehrheitlich in ihrer Expression induzierten Gruppe der in die Signaltransduktion involvierten Gene (z.B. *son of sevenless homolog 1* (SOS)) sticht ein Gen heraus. Das an der Aktivierung der MAPK beteiligte C5 (*complement component 5*), das um mehr als den Faktor 2 in seiner Konzentration reduziert ist, ist das einzige und ausschließlich durch die Liganden-Reduktion regulierte Gen. Die für die Zelladhäsion benötigten Gene (z.B. CDH6 (Cadherin 6), CDH19 (Cadherin 19)) werden ebenso wie in die Transkription involvierte Gene und Zellzyklusgene (histone deacetylase 5 (HDAC5), TGFβ2, *cyclin G2* (CCNG2)) überwiegend überexprimiert. Gemessen an der Konzentration der mRNA der für die DNA-Replikation verantwortlichen Gene, scheint dieser Prozess reduziert abzulaufen, denn alle der DNA-Replikation zuzuordnenden Gene sind runterreguliert. Einzige Ausnahme bildet das in seiner Expression induzierte Gen RBMS1 (*RNA binding motif, single stranded interacting protein 1*), welches als einziges durch die IGF-II-Reduktion und zusätzlich durch die IGF1R-reduktion reguliert ist.

### 3.5.4.2. Identifikation und Validierung durch siRNA-Transfektion spezifisch regulierter Gene

Neben der Betrachtung komplexer Funktionsgruppen wurden auch einzelne regulierte Gene gesucht, welche Gemeinsamkeiten oder Unterschiede in den verschiedenen siRNA-Inhibierungen belegen können. Aus den verschiedenen Schnittmengen (Tabelle 4) wurden Gene herausgesucht, die direkt mit dem IGF-Signalweg oder Apoptose, Proliferation und Signaltransduktion assoziiert sind. Außerdem waren Gene von Interesse, die spezifisch nur durch eine der verschiedenen siRNA-Transfektionen reguliert wurden. In einer solchen spezifischen Regulation könnte die Erklärung für die unterschiedliche Wirkungsweise der verschiedenen Ansätze liegen. Die ausgewählten Gene sind in Tabelle 6 zusammengefasst.

Gene	Gene Symbol	IGF-II ds1	IGF-II ds3	INSR ds1	IGF1R ds3	Rez. Mix	nonsense siRNA
Cyclin A2	CCNA2	0,8	0,7	0,9	0,6	0,8	0,8
Cyclin G2	CCNG2	1,2	1,9	0,9	1,9	1,4	1,4
insulin-like growth factor binding protein 1	IGFBP-1	0,9	1,0	1,0	1,2	1,7	0,8
complement component 5	C5	0,4	0,4	0,8	0,9	1,0	0,7
bone morphogenetic protein 4	BMP4	1,7	1,5	0,9	1,2	1,2	1,1
tumor necrosis factor, alpha-induced protein 8	TNFAIP8	2,0	2,0	0,9	1,1	1,1	1,4
mitogen-activated protein kinase 9	MAPK9	0,8	1,0	0,8	0,6	0,6	1,0
insulin-like growth factor 2 receptor	IGF2R	1,1	1,2	1,0	1,9	1,6	1,0
tissue inhibitor of metalloproteinase 1	TIMP1	2,9	1,7	1,0	1,8	1,4	1,4
tissue inhibitor of metalloproteinase 2	TIMP2	2,2	1,5	1,1	1,8	1,5	1,1
transforming growth factor, beta 2	TGFB2	1,8	1,6	1,1	2,2	1,6	1,0
insulin-like growth factor binding protein 2	IGFBP-2	2,8	2,2	0,8	2,3	2,0	1,0
dickkopf homolog 1	DKK1	1,6	2,2	1,3	1,7	1,7	1,3

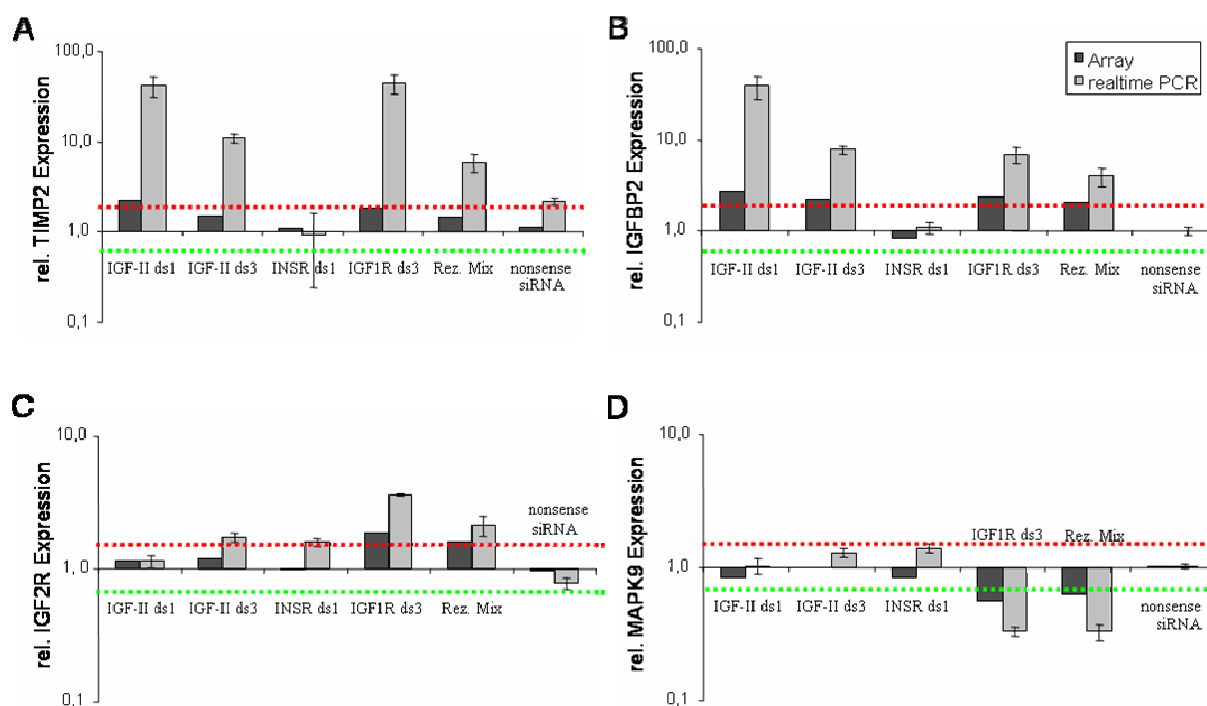
**Tabelle 6: Auswahl einiger durch die genspezifische siRNA-Transfektion regulierter Gene**

Auswahl einiger interessanter Gene aus den verschiedenen Schnittmengen-Analysen, die spezifische durch eine oder durch verschiedene siRNA-Transfektionen in ihrer Expression reguliert wurden. Die Regulation der einzelnen Gene nach den verschiedenen Behandlungen ist als x-fache Veränderung im Vergleich zur Expression in unbehandelten Zellen angegeben. Zur leichteren Orientierung sind dabei Reduktionen grün, Induktionen rot unterlegt.

Keines der ausgewählten Gene wurde durch die Transfektion der INSR siRNA ds1 und der nonsense siRNA in seiner Expression um mindestens den Faktor  $\pm 1,5$  verändert. Durch alle anderen siRNA Transfektionen wurde die mRNA Expression der Gene *timp2*, *tgfb2*, *IGFBP-2* und *dkk1* induziert. Mit Ausnahme der kombinierten Rezeptorinhibierung konnte auch ein Anstieg der TIMP1 mRNA Konzentration im Array nachgewiesen werden.

Unterschiede zwischen der Liganden- und der Rezeptorreduktion zeigten sich zum Beispiel bei der MAPK9 und der IGF2R Expression. Die Transfektion beider IGF-II-spezifischen siRNA-Sequenzen führte zu keiner Veränderung der Genexpression. Durch die kombinierte Rezeptor- und die alleinige IGF1R-Inhibierung kam es jedoch zur Verringerung der MAPK9

mRNA und zu einer deutlichen Induktion des IGF2R. Andere Gene wurden spezifisch nur durch die Reduktion des IGF1R modifiziert. Cyclin A2 wurde um den Faktor 1,5 dezimiert, während das Cyclin G2 um ca. 100% in seiner Expression gesteigert wurde. Ausschließlich nach der kombinierten Transfektion beider Rezeptor-spezifischen siRNAs wurde das IGFBP-2 induziert. Sowohl die Liganden-Reduktion wie auch die alleinige Inhibierung der beiden Rezeptoren führten zu keiner Veränderung des Expressionsprofils. Die IGF-II-Inhibierung unterschied sich durch sowohl durch die verstärkte wie auch durch die verringerte Expression verschiedener Gene. Eine Verdopplung der TNFAIP8 mRNA ist ebenso wie die deutlich gesteigerte Expression der BMP4 mRNA einzigartig für die IGF-II-Reduktion. Auch eine Verringerung der C5 mRNA um 60% ist nur nach der Inhibierung des Liganden zu beobachten. Das Expressionsprofil einiger ausgewählter Gene wird in der ‚realtime‘ PCR überprüft (Abbildung 29).



**Abbildung 29: Vergleichende Darstellung der in den Array-Analysen und in der ‚realtime‘ PCR ermittelten mRNA-Expressionsprofile ausgewählter Zielgene**

Die relative mRNA Expression von TIMP2 (Abb. A), IGFBP-2 (Abb. B), IGF2R (Abb. C) und MAPK9 (Abb. D) aus der Array-Analyse (dunkle Balken) wurde den in der semiquantitativen PCR (helle Balken) ermittelten Werten gegenübergestellt. Die Expressionswerte wurden gegen die Expression unbehandelter Zellen kalibriert. Die Schwelle der  $\pm 1,5$ -fachen Regulation ist in den Diagrammen als rote (Induktion) und grüne (Reduktion) Linie eingezeichnet.

Die vergleichende Darstellung bestätigte, dass sich zwar das prinzipielle Profil der Expression nicht unterscheidet, das Ausmaß der Regulation zeigte sich jedoch deutlich stärker in der ‚realtime‘ PCR. So lag TIMP2 (Abbildung 29A) nicht mehr um den Faktor 2, sondern durch IGF-II ds1 und IGF1R-Inhibierung um das 40fache, durch IGF-II ds3 und die kombinierte

Rezeptorreduktion immerhin noch um das 10- bzw. 6-fache induziert vor. Auch die spezifische Veränderung der MAPK9 (Abbildung 29D) durch die Inhibierung beider Rezeptoren oder nur des IGF1R zeigte sich in der ‚*realtime*‘ PCR mit einer Reduktion um den Faktor 3,3 im Vergleich zu der 1,6fachen Reduktion laut Array-Analyse in ihrem Ausmaß verdoppelt. Die Effekte der siRNA-Transfektion auf die IGFBP-2-(Abbildung 29B) wie auch auf die IGF2R-Expression (Abbildung 29C) wurden prinzipiell bestätigt, traten in der ‚*realtime*‘ PCR jedoch deutlicher hervor.

### **3.6. Kombinationsbehandlung der Tumorzellen: IGF-II-Reduktion mit Celecoxib oder Cisplatinapplikation**

Da die Reduktion des Liganden IGF-II in Huh-7-Zellen nicht nur antiproliferative und proapoptotische Effekte induzierte, sondern im Vergleich zur Rezeptorreduktion zur deutlicheren Phosphorylierungsmodifikation der beteiligten Signalwegskomponenten führte, wurde dieser Ansatz in Kombination mit der Gabe in der Krebstherapie verwendeter Medikamente getestet.

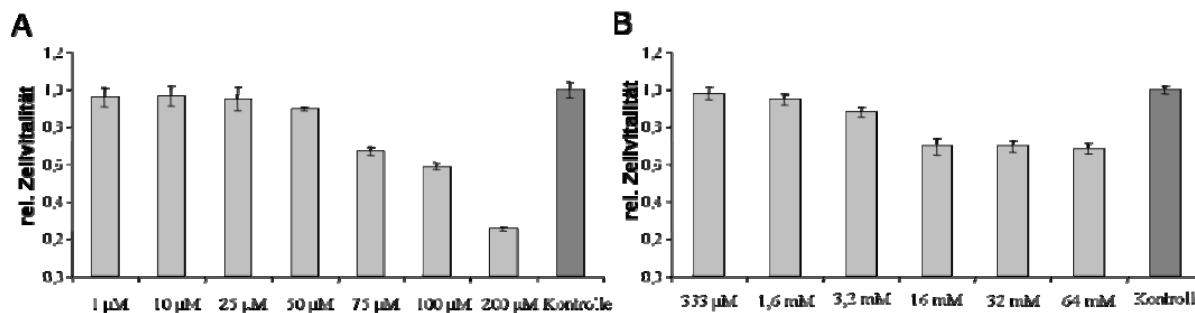
Zum einen wurden Huh-7-Zellen am Tag nach der Transfektion der IGF-II ds3 siRNA für 48 Std. mit dem antineoplastischen Wirkstoff Celecoxib, ein selektiver Cyclooxygenase (COX)-2 Hemmer, behandelt. Celecoxib wird bereits zur Behandlung der familiären adenomatösen Polyposis (FAP), einer präkanzerösen Läsion des Kolons, eingesetzt. Außerdem erfolgte die Behandlung mit dem Chemotherapeutikum Cisplatin, welches durch inter- und intramolekulare Verbindungen der DNA-Stränge die DNA-Replikation inhibiert und durch Bindung an freie Sulfhydryl-Gruppen des Tubulins dessen partielle Depolymerisierung bewirkt. Cisplatin wird bei der Therapie hepatozellulärer Karzinome und anderer solider Tumore angewandt wird.

#### **3.6.1. Konzentrationskinetik der Wirkstoffe**

Da die synergistische Wirkung beider Ansätze überprüft werden sollte, wurden zunächst die Effekte der Substanzen in Abhängigkeit ihrer Konzentration auf Huh-7-Zellen getestet.

Vor dem Einsatz der Chemotherapeutika wurde der Einfluß der Lösungsmittel DMSO und DMF auf die Zellen getestet. Durch die im Rahmen des Versuches verwendeten Konzentrationen konnte keine Beeinflussung der Zellvitalität nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Celecoxib (Abbildung 30A) zeigte bis zu einer Konzentration von 25µM nach 48 Std. keinen Einfluss auf die Zellvitalität. Bei einer Behandlung der Zellen mit einer 50 µM Celecoxib-Lösung wurde die Zellvitalität um 10% reduziert, 75 µM und 100 µM Celecoxib zeigten mit einer Vitalitätsreduktion um 34% bzw. 40% deutlich stärkere Effekte. Bei der

Inkubation der Zellen mit 200  $\mu\text{M}$  des COX-2 Hemmers lag die Vitalität nach 48 Std. bei nur noch 25%.



**Abbildung 30: Einfluß der Celecoxib- und Cisplatinkonzentration auf die Vitalität von Huh-7**

Huh-7-Zellen wurden mit Celecoxib in einem Konzentrationsspektrum von 1  $\mu\text{M}$  bis 200  $\mu\text{M}$  für 48 Std. inkubiert (Abb. A). Cisplatin wurde in einem Bereich von 333  $\mu\text{M}$  bis 64 mM über denselben Zeitraum getestet. Die Vitalität der Zellen wurde mittels MTT-Test bestimmt, als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen.

Die 48-stündige Behandlung der Zellen mit 1,6 mM Cisplatin bewirkte eine Reduktion der Zellvitalität um 5%, eine Gabe von 3,2 mM ließ die Vitalität auf 88% sinken. Bei einer Konzentration von 5  $\mu\text{g/ml}$  (16 mM), die zu einer ~30%igen Reduktion stoffwechselaktiver Zellen führte, schien der maximale Effekt auf die Zellvitalität erreicht, es konnte durch eine weitere Steigerung der Konzentration keine verstärkte Beeinträchtigung der Zellvitalität hervorgerufen werden (Abbildung 30B).

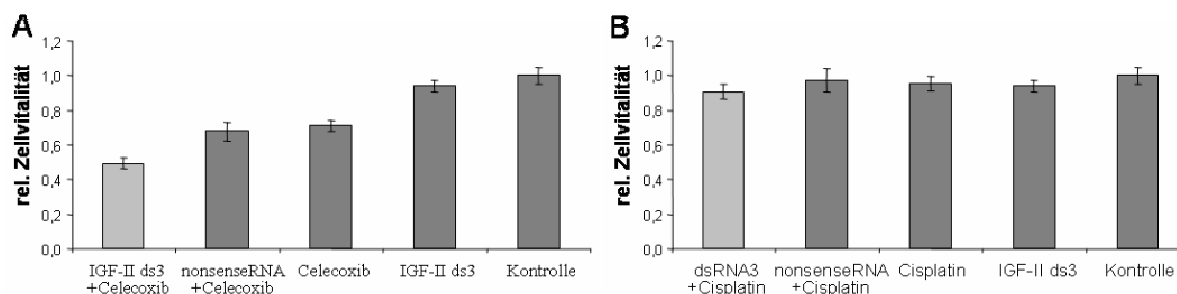
Da in den folgenden Experimenten die kombinierte Wirksamkeit der IGF-II-Inhibierung mit der Wirkstoffbehandlung ermittelt werden sollte, wurden Konzentrationen der Medikamente gewählt, bei denen noch kein massiver vitalitätsreduzierender Effekt beobachtet werden konnte (Cisplatin 1,6 mM, Celecoxib 60  $\mu\text{M}$ ).

### 3.6.2. Kombination der IGF-II-Reduktion mit der Wirkstoffapplikation

Die Zellen wurden initial mit siRNA IGF-II ds3 transfiziert. Nach weiteren 24 Std. begann die Behandlung mit dem jeweiligen Medikament (1,6 mM Cisplatin, 60  $\mu\text{M}$  Celecoxib). Abweichend von den bisher gezeigten Vitalitätsbestimmungen wurde der MTT-Test in diesem Experiment bereits an Tag 3 nach der Inhibierung durchgeführt, damit die Behandlung des Chemotherapeutikums für 48 h zum Zeitpunkt der maximalen mRNA-Reduktion erfolgen konnte. Als Kontrollen dienten neben unbehandelten Zellen auch Zellen, die nur mit siRNA IGF-II ds3 transfiziert, nur mit der entsprechenden Wirkstoffkonzentration behandelt oder mit nonsense siRNA transfiziert und mit der entsprechenden Wirkstoffkonzentration behandelt wurden (Abbildung 31).

Die Behandlung der IGF-II ds3 siRNA transfizierten Zellen mit dem selektiven COX-2 Inhibitor zeigte superadditive Effekte, im Vergleich zu allen Kontrollen kam es zu einer

hochsignifikanten Reduktion der Vitalität ( $p=9,08 \times 10^{-5}$ , Abbildung 31A). Da die Transfektion der IGF-II-spezifischen siRNA allein eine Vitalitätsreduktion um 6% bewirkte und die Celecoxibgabe einen Verlust vitaler Zellen von 29% erzeugte, lag der Wert der Kombinationsbehandlung mit einer Vitalitätsreduktion um 51% über der Summe der Einzeleffekte.



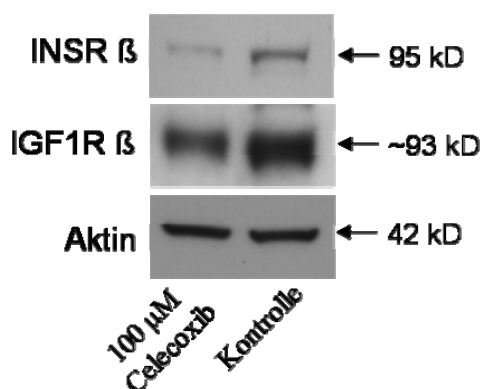
### Abbildung 31: Vitalitätsreduktion durch kombinierte siRNA- und Wirkstoffgabe

Am Tag nach der Inhibierung wurde die 48stündige Behandlung mit 50  $\mu$ M Celecoxib (Abb. A) und 1,6 mM Cisplatin (Abb. B) begonnen. Im MTT-Test wurden die Effekte der kombinierten IGF-II-spezifischen siRNA Transfektion plus Wirkstoffgabe (heller Balken) im Vergleich zu den verschiedenen Kontrollen (dunkle Balken) untersucht.

Die Kombinationsbehandlung der Zellen mit Cisplatin und IGF-II-Inhibierung führte zu keiner biologisch relevanten Beeinflussung der Zellvitalität (Abbildung 31B). Im Vergleich zu der Summe der Einzeleffekte (Cisplatinbehandlung -5%, IGF-II ds3 Transfektion -6%) konnte keine weitere Reduktion der Zellvitalität nachgewiesen werden, die Restvitalität im Vergleich zu unbehandelten Zellen lag bei 90%.

### 3.6.3. Auswirkung von Celecoxib auf die IGF1R- und INSR-Expression

Außer der Kombinationsbehandlung wurde auch die Auswirkung der Celecoxib-Applikation auf die Expression des INSR und des IGF1R in Huh-7-Zellen analysiert. Nach 24stündiger Behandlung der Zellen mit 100  $\mu$ M Celecoxib wurden Gesamtproteinfraktionen isoliert und auf die INSR und IGF1R-Konzentration hin untersucht. Die Western Blot Analyse zeigte eine Reduktion sowohl des IGF1R wie auch des INSR im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen (Abbildung 32).



### Abbildung 32: Rezeptorexpression in Huh-7 nach Celecoxibbehandlung

Nach einer 24stündigen Behandlung der Zellen mit 100  $\mu$ M Celecoxib wurde die Konzentration des IGF1R und des INSR im Western Blot untersucht.



## 4. Diskussion

Obwohl das HCC eines der häufigsten humanen Malignome ist, existiert bis jetzt keine suffiziente Therapiemöglichkeit. Der Tumor spricht nicht auf gängige Chemotherapeutika an und operative Verfahren wie Leberteileresektion und Lebertransplantation sind nur bei 5% aller Patienten möglich. Da eine Subgruppe der HCCs durch eine starke Überexpression des Wachstumsfaktors IGF-II, der Proliferation, Antiapoptose und Zelldifferenzierung in Zellen epithelialen Ursprungs vermitteln kann, charakterisiert ist, wurde im Rahmen dieser Arbeit die Relevanz und Funktion der Rezeptoren und des Liganden für die Signaltransduktion in der Hepatokarzinogenese untersucht. Ziel der Arbeit war es, durch genspezifische RNA-Inhibierung mittels *RNAinterference* einzelne Komponenten des IGF-Signalweges auszuschalten, und anhand der Analyse der biologischen Effekte mögliche therapeutische Zielstrukturen innerhalb dieses Signalweges zu identifizieren.

### 4.1. Methodische Aspekte der mRNA-Inhibierung

In beiden HCC-Zelllinien (Huh-7, Hep3B) konnte durch die Transfektion von genspezifischen siRNAs eine signifikante Reduktion der mRNA Konzentration erzielt werden; diese führte bei der Inhibierung der Rezeptoren zu einem deutlichen Verlust des Proteins. Aufgrund mangelnder Sensitivität der zur Verfügung stehenden Nachweismethoden (z.B. Western Blot Analysen, IGF-II-spezifischer ELISA) war eine Quantifizierung des sezernierten IGF-II-Proteins in den Zellkulturüberständen nicht möglich. Jedoch führten nicht alle getesteten siRNAs zu einer nahezu vollständigen Inhibierung. Im Falle der INSR ds3 siRNA konnte keine Reduktion der mRNA detektiert werden, obwohl sie nach den gleichen bioinformatischen Kriterien ausgewählt wurde (2.1.4.3). Dieses Phänomen wurde auch schon von anderen Arbeitsgruppen beschrieben (178, 179). In Abhängigkeit von der siRNA-Sequenz kommt es, unter anderem beeinflusst von der Sekundärstruktur der mRNA im Sequenzbereich der jeweiligen siRNA, zu einem unterschiedlich stark ausgeprägten ‚*Silencing*‘. Trotz der inzwischen erheblich verbesserten Selektionskriterien für siRNAs kann ihre Inhibierungseffizienz nicht vorhergesagt werden. Daher ist es nach wie vor unerlässlich, verschiedene siRNAs hinsichtlich ihrer Wirksamkeit zu testen, um die jeweils optimale Sequenz für das zu inhibierende Gen zu finden.

Ein weiteres Problem ist die mögliche Induktion einer unspezifischen Interferon-Antwort durch das Einbringen doppelsträngiger RNA-Moleküle (180). Im Gegensatz zu niederen Eukaryoten, bei denen eine solche Reaktion bisher nicht beobachtet werden konnte, reagieren

Säugetierzellen auf dsRNA-Moleküle mit einer Länge von mehr als 30 Basenpaaren mit einer Interferon-assoziierten Abwehrreaktion. Es wird versucht, das Auftreten dieser unspezifischen Immunantwort durch das Einbringen kurzer siRNAs zu verhindern, dennoch wurde in Einzelfällen eine Aktivierung Interferon-regulierter Gene beobachtet (z.B. OAS-2 und -3, Stat1, PKR (interferon-induced double-stranded RNA-activated Protein Kinase)) (157, 159). Im Rahmen dieser Arbeit konnte diese unspezifische Antwort aufgrund fehlender Aktivierung der OAS-2-Expression und der Stat1-Phosphorylierung mit der gebotenen Sicherheit ausgeschlossen werden. Für dieses Modellsystem wurde also davon ausgegangen, dass die durch die siRNA-Transfektion induzierten Effekte nicht durch eine Induktion der Interferon-Antwort beeinflusst wurden.

Ein weiterer wichtiger Aspekt ist die mögliche unspezifische Inhibierung einer siRNA (*off-target* Effekt). So regulierte die nonsense siRNA, für die keine komplementäre Sequenz auf cDNA und auf genomischer Ebene gefunden wurde, zahlreiche Gene in den Array-Expressionsanalysen. Dass es sich nicht um prinzipielle Nebeneffekte der siRNA Transfektion handelt, verdeutlicht die Regulation von nur 16 Genen nach INSR-Inhibierung im Vergleich zu 404 regulierten Genen nach nonsense siRNA Transfektion. Es erwächst somit die Frage, in welchem Umfang diese *off-target* Effekte bei den Kontrollen (nonsense siRNA) und den genspezifischen Inhibierungen zu erwarten sind und wie man diese in den folgenden Analysen berücksichtigt.

Widersprüchliche publizierte Daten belegen, dass die Diskordanz eines einzelnen Basenpaares zwischen siRNA und mRNA die Spaltung der mRNA verhindern kann (181, 182), während in anderen Publikationen auch eine effiziente Inhibierung trotz 1-2 unterschiedlichen Basenpaaren beschrieben wurde (183). Neuere Erkenntnisse weisen jedoch darauf hin, dass noch geringere Übereinstimmungen zwischen siRNA und mRNA zu einer mRNA-Degradation oder Inhibierung der Proteintranslation führen können. Der Grad der Sequenzhomologie ist dabei, ausgenommen bei vollständiger Übereinstimmung, nicht ausschlaggebend für eine Degradation der mRNA. Dabei gestaltet sich die Prognose der *off-target*-Effekte jedoch schwierig, denn die *in silico* identifizierte Anzahl möglicher *off-target*-Gene übertrifft die letztendlich regulierte Anzahl deutlich (184). Ferner belegen Studien, dass nur geringe Unterschiede zwischen siRNAs zu teilweise. gegensätzlichen Effekten auf Expressionsebene von Genen führen, die nicht das primäre Ziel der siRNA darstellen und zu diesem keine funktionelle Verbindung oder Sequenzhomologie aufweisen (179).

Eine Möglichkeit, die unspezifischen und unvorhersehbaren Effekte in der Betrachtung und Auswertung der Array-Analysen zu berücksichtigen, ist, wie in dieser Arbeit praktiziert, die Verwendung verschiedener zu einem Zielgen homologen siRNAs und die 'Subtraktion' der durch die verwendete nonsense siRNA entstandenen Effekte. In Anbetracht der neuesten Erkenntnisse über die Methode der RNAi, müssen die so generierten Ergebnisse jedoch zusätzlich mit einer unabhängigen Methode oder einer funktioneller Analyse bestätigt werden.

#### **4.2. Auswirkungen der Inhibierungen auf Vitalität, Proliferation und Apoptose**

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte sowohl durch die IGF-II- wie auch durch die IGF1R-Inhibierung und die gleichzeitige Inhibierung beider Rezeptoren eine signifikante Reduktion der Vitalität und der Proliferation wie auch eine Apoptoseinduktion in HCC-Zellen erzielt werden. Diese Ergebnisse und bereits publizierte Daten mit *antisense* Oligonukleotiden stehen im Widerspruch zu zuvor durchgeführte Inhibierungsversuche in Huh-7 und Hep3B-Zellen mit neutralisierenden Antikörpern. Hier konnten durch Antikörper gegen IGF-II und IGF1R weder eine Apoptoseinduktion noch antiproliferative Effekte erzielt werden (185). Die Degradation der mRNA ist somit wahrscheinlich aufgrund der hohen Inhibierungseffizienz der sterischen Inhibierung durch neutralisierende Antikörper überlegen.

##### *IGF-II-Inhibierung*

Ein der RNAi ähnlicher Ansatz, die IGF-II-Reduktion mittels *antisense* Oligonukleotiden, führte ebenfalls zu einer reduzierten Proliferation in HCC-Zellen und ist mit den vorliegenden Ergebnissen kongruent (122). Auch in verschiedenen Prostatatumorzelllinien konnte durch die transiente retrovirale Expression von IGF-II-spezifischen Ribozymen eine durch IGF-II-Reduktion vermittelte Induktion der Apoptose und Reduktion des Zellwachstum nachgewiesen werden (186). Diese Ergebnisse ließen sich im Tiermodell bestätigen. In einem Xenograft-Mausmodell (Hep3B-Zellen wurden in Mauslebern transplantiert) führte das Einbringen eines zur IGF-II Promotorregion 4 komplementären methylierten Oligonukleotids zu einer drastischen IGF-II-Reduktion. Diese Reduktion war mit signifikant geringerem Wachstum der Lebertumoren verbunden und korrelierte mit einer besseren Überlebensrate der Mäuse (187).

In den hier durchgeführten Experimenten bewirkte sowohl in Huh-7- wie auch in Hep3B-Zellen die IGF-II siRNA ds1 im Vergleich zur siRNA ds3 eine stärkere Reduktion der Proliferation, während IGF-II ds3 in beiden Zelllinien zu einer deutlicheren Induktion der Apoptose führte. Diese zunächst widersprüchlich erscheinenden Effekte der beiden IGF-II-

spezifischen siRNAs mögen auf der komplexen Expressionregulation des IGF-II-Gens beruhen. IGF-II wird entwicklungs- und gewebsabhängig von insgesamt vier verschiedenen Promotoren exprimiert. In Huh7- und Hep3B-Zellen wurden ein 4,8 kb und ein 6 kb großes Transkript nachgewiesen (131), welche von den Promotoren P3 (6 kb) und P4 (4,8 kb) transkribiert werden (188). Beide IGF-II-spezifischen siRNAs sind komplementär zu Bereichen, die in beiden Transkriptvarianten vorhanden sind. Allerdings können verschiedene siRNAs trotz vollständiger Sequenzhomologie der Sequenzen zu einer unterschiedlich effizienten Reduktion der mRNA-Konzentration führen (179). Daher ist es denkbar, dass eine der beiden siRNAs zu einer selektiven Sekundärstruktur-abhängigen Degradation der Transkripte führt. Da P3-generierte Transkripte überwiegend in proliferierenden Zellen nachweisbar sind und P4-abhängige Transkripte mit einer konstitutiven IGF-II-Expression assoziiert sind (189), könnte ein selektiver Abbau der unterschiedlichen Transkripte die beobachteten biologischen Effekte erklären.

### *Rezeptorinhibierung*

Die Daten der vorliegenden Arbeit, welche eine signifikante Apoptoseinduktion wie auch eine Reduktion der Tumorzellvitalität und der Proliferation durch die IGF1R- und die kombinierte INSR/IGF1R-Reduktion belegen, werden durch andere Arbeiten bestätigt. Einen signifikanten Anstieg der Apoptose durch IGF1R-Reduktion konnte in verschiedenen Prostata-Zelllinien nach RNAi nachgewiesen werden (190). Ferner konnte gezeigt werden, dass der IGF1R antiapoptotische (191) und proliferative (192) Eigenschaften vermittelt.

Die Nutzung des IGF1R als signaltransduzierenden Rezeptor durch weitere Liganden (z.B. IGF-I) könnte ursächlich für die drastischen biologischen Effekte (Proliferationsreduktion) nach IGF1R-Inhibierung im Vergleich zur spezifischen IGF-II-Inhibierung sein (96, 190). Dass eine solche Stimulation durch andere Liganden in diesem HCC-Modellsystem erfolgen kann, wird durch den Expressionsnachweis von IGF-I in Hep3B-Zellen und in Huh-7-Zellen bestätigt (193). Eine Blockade des IGF1R unterbindet die IGF-I-vermittelten biologischen Effekte vollständig, denn im Gegensatz zu IGF-II bindet IGF-I nicht an den INSR, sondern exklusiv an den IGF1R (96, 194).

Die hier vorgestellten Daten und publizierten Ergebnisse legen nahe, dass IGF-II *in vitro* wie auch *in vivo* antiapoptotisch und proliferativ auf verschiedene HCC-Zellen wirkt. Diese Effekte werden zumindest durch den IGF1R-vermittelt, der jedoch auch gegenüber anderen Wachstumsfaktoren responsiv ist. Eine Inhibierung dieses Rezeptors würde somit auch immer

die biologischen Effekte anderer Liganden, und nicht nur von IGF-II, maßgeblich beeinflussen.

#### **4.3. Auswirkungen der Inhibierungen auf intrazelluläre Signaltransduktionsmoleküle**

Die IGF-II-Inhibierung führte in Huh-7-Zellen im Vergleich zu den Hep3B-Zellen zu einer deutlicheren Veränderung des Phosphorylierungsstatus der analysierten Signalmoleküle AKT/PKB, Src, ERK und Pax. In den funktionellen Analysen hingegen konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Zelllinien festgestellt werden, weder bei der Apoptoseinduktion noch der Proliferationsreduktion. Eine mögliche Ursache für diese Diskrepanz zwischen den HCC-Zelllinien stellt die höhere IGF-II-Produktion der Hep3B-Zellen dar (mRNA-Konzentration in der ‚*realtime*‘ PCR ca. 5x mehr als in Huh-7). Eine Inhibierung in Hep3B-Zellen könnte somit zu einer weniger deutlichen Abnahme des Liganden führen, die verbleibende IGF-II-Menge könnte die Stimulation der zytoplasmatischen Signalmoleküle im Vergleich zu den Kontrollen erklären. Dies würde auch die relativ effiziente Phosphorylierungsmodifikation der Rezeptorinhibierungen im Vergleich zu den IGF-II-Reduktionen erklären; bei hoher IGF-II-Konzentration stellt die Anzahl der Rezeptoren den limitierenden Faktor dar (195). Ferner besteht die Möglichkeit, dass den untersuchten Signalmolekülen in Hep3B-Zellen nicht die zentrale Rolle bei der Vermittlung der IGF-II-induzierten Effekte zukommt wie in den Huh-7-Zellen. Es könnten andere, nicht näher untersuchte Kinasen in ihrer Aktivität modifiziert werden und so zu den funktionellen Effekten führen.

##### **4.3.1. INSR und IGF1R, beide Rezeptoren vermitteln IGF-II induzierte Effekte**

ERK und AKT/PKB, die im Rahmen des IGF-II-Signalweges proliferative bzw. antiapoptotische Effekte vermitteln, wurden auch durch die kombinierte, jedoch nicht durch die alleinige Reduktion einer der beiden Rezeptoren hinsichtlich ihrer Phosphorylierung beeinflusst. Eine mögliche Erklärung für die deutlicheren Effekte nach kombinierter Rezeptorreduktion ist eine alternative Signaltransduktion des IGF-II sowohl über den IGF1R wie auch über den INSR. Der INSR könnte somit den Ausfall des IGF1R hinsichtlich der IGF-II-vermittelten Effekte kompensieren, denn obwohl die alleinige Reduktion des INSR keine funktionellen Auswirkungen hat, führt seine Reduktion zusammen mit der Inhibierung des IGF1R zur deutlichsten Veränderung des Phosphorylierungszustandes der Signalmoleküle. Lange Zeit wurde angenommen, dass IGF-II nur mit sehr geringer Affinität an den INSR bindet und es sich bei diesem Rezeptor nicht um einen funktionellen IGF-II-Rezeptor mit biologischer Relevanz handelt. Frasca *et al.* gelang es jedoch nachzuweisen,

dass die INSR Isoform A, im Gegensatz zur Isoform B, IGF-II mit einer der IGF1R-Bindung vergleichbaren Affinität bindet (96). Die Aktivierung dieses Rezeptors durch Insulin vermittelt überwiegend metabolische Effekte, während durch die IGF-II-Bindung mitogene Effekte induziert werden (96, 196). *In vitro* konnte eine Aktivierung sowohl des PI3K wie auch des ERK Signalweges durch die IGF-II-Bindung an die INSR Isoform A bestätigt werden (197).

Dieser Sachverhalt wird durch *in vivo* Daten im *knock-out* Tiermodell unterstützt. Tiere mit einem defekten IGF-II-Gen wiesen eine deutlich stärkere Wachstumsretardierung auf als Tiere mit fehlendem IGF1R (198). Weitere Studien zeigten, dass der IGF-II *knock-out* Phänotyp dem doppelt mutanter Mäuse, ohne INSR- und IGF1R-Expression, entsprach, was die Hypothese bestätigt, dass die Isoform A des INSR einen alternativen funktionellen IGF-II-Rezeptor darstellt (194).

Wenn ausschließlich der IGF1R und der INSR die für die IGF-II-vermittelten Effekte verantwortlichen Rezeptoren sind, sollten die Auswirkungen auf die Zelle nach kombinierter Rezeptorreduktion mit den Auswirkungen der Ligandenreduktion vergleichbar sein. Die durch die IGF-II-Inhibierung erzielte Dephosphorylierung in Huh-7-Zellen ist jedoch deutlicher als nach kombinierter Rezeptorreduktion. Eine Erklärung für diesen Sachverhalt mag sein, dass auch nach kombinierter Rezeptorinhibierung noch geringe Mengen INSR oder IGF1R existieren. Dies könnte auf eine konzentrationsabhängige Wirkung der siRNA hinweisen, denn die kombinierte Rezeptorinhibierung wurde nur mit halber Menge der einzelnen siRNA (IGF1R ds3 und INSR ds1) durchgeführt, um die Gesamtkonzentration an siRNA-Molekülen nicht zu erhöhen (Vermeidung eines Interferon-Effektes). Obwohl im Western Blot keine Signale für den INSR und den IGF1R nach kombinierter Inhibierung zu detektieren waren, könnten geringste residuale Mengen dennoch zu einer Signalweiterleitung beitragen. Eine weitere Erklärung für den deutlicheren Einfluss nach alleiniger IGF-II-Inhibierung ist die Existenz eines weiteren Rezeptors oder IGF-II-assoziierten Signalweges. In diesem Fall wäre eine gleichzeitige Reduktion des INSR und des IGF1R für eine vollständige Blockade der IGF-II-vermittelten Effekte nicht ausreichend. Diese Hypothese wird durch kürzlich publizierte Daten gestützt. Cadoret und Kollegen konnten in einem Mausmodell zeigen, dass die c-myc induzierte Hepatokarzinogenese, die mit einer massiven IGF-II-Produktion assoziiert ist, nicht der Expression des IGF1R bedarf. Alle c-myc überexprimierenden Mäuse entwickelten unabhängig von ihrem IGF1R-Status im gleichen Zeitraum Lebertumore, so dass die Existenz eines alternativen Rezeptors für die IGF-II-Signaltransduktion diskutiert wird, da in allen Tumoren eine Erhöhung von IRS1 und IRS2

dokumentiert wurde (199). Das zunächst erwartete Ausweichen auf den INSR Isoform A konnte nachweislich allerdings nicht erfolgen, da in den Tieren keine Expression dieser Splicevariante des INSR nachgewiesen werden konnte. Die potentielle Existenz eines weiteren IGF-II-Rezeptors wird jedoch kritisch diskutiert, denn der Phänotyp des INSR/IGF1R doppelt *knock-out* Modells entspricht dem der IGF-II *knock-out* Tiere und würde somit gegen einen solchen alternativen Signalweg sprechen (194).

Unabhängig von der offenen Frage, ob es neben INSR und IGF1R einen weiteren IGF-II-bindenden Rezeptor mit vergleichbarer Funktion gibt, kann anhand der vorliegenden Daten geschlossen werden, dass nicht der IGF1R allein für die Vermittlung der IGF-II-induzierten Effekte in HCC-Zellen verantwortlich ist. Der INSR ermöglicht eine alternative, IGF1R-unabhängige Signaltransduktion, die zur Stimulation gleicher Effektoren führt.

#### **4.3.2. Auswirkungen der IGF-Achsen-Inhibierung auf die Adhäsion**

Paxillin (Pax) ist ein Adapterprotein, das selbst keine katalytische Funktion, aber verschiedene Proteinbindemotive besitzt. Es ist häufig mit dem Protein ‚*Focal Adhesion Kinase*‘ (FAK) assoziiert und in die Organisation und Funktion fokaler Adhäsion involviert. Eine Dephosphorylierung von Pax weist auf einen Verlust der Zelladhäsion hin (195) und ist durch die IGF-II-vermittelte Signaltransduktion bzw. eine gesteigerte Phosphorylierung nach gezielter IGF-II-Inhibierung bis jetzt noch nicht beschrieben worden. Allerdings konnte in der epithelialen Brustkrebs-Zelllinie MCF7 eine Dephosphorylierung von FAK und den assoziierten Proteinen Cas (Crk-associated substrate) und Pax nach IGF-I-Stimulierung nachgewiesen werden (195). Parallel zur Dephosphorylierung von Pax kommt es *in vitro* zu einem Abbau der Aktinfilamente, zu einem Verlust der Pax-Lokalisation an fokalen Adhäsionspunkten und einem Auflösen der Monolayer-Struktur. Diese Daten deuten auf eine zentrale Rolle des Pax in Verbindung mit der IGF-Signaltransduktion bei der Zelladhäsion hin (200).

Die Tyrosinkinase Src wird in Huh-7-Zellen durch die IGF1R- und die kombinierte IGF1R/INSR-Inhibierung ebenso wie durch die IGF-II-Inhibierung massiv dephosphoryliert und auch die Reduktion des INSR reduziert die Phosphorylierung deutlich. Wie auch Paxillin ist Src an der Zelladhäsion beteiligt. In Kolonkrebs-Zelllinien konnte eine Reduktion der Zell-Zell-Kontakte durch konstitutiv aktives Src nachgewiesen werden; als Grund hierfür wird die mit Src-Aktivität assoziierte verringerte Oberflächenpräsenz des Proteins E-cadherin diskutiert (201). Übereinstimmend mit diesen Daten, konnte in Kolonkarzinomen mit

erhöhtem Metastasierungspotential eine erhöhte Src-Kinase-Aktivität nachgewiesen werden (202).

Die aufgrund der Phosphorylierungsmodifikation der zytoplasmatischen Signalmoleküle Pax und Src generierte Hypothese, dass die IGF-II-vermittelte Signaltransduktion deutlichen Einfluss auf die Zelladhäsion und damit ggf. auf die Invasion und Metastasierung ausübt, wird durch die Expressions-Daten untermauert. Sowohl die IGF-II-Inhibierung wie auch die IGF1R- und die kombinierte Rezeptorinhibierung resultieren in einer vermehrten Expression Adhäsions-assoziiierter Moleküle (E-cadherin, Cadherin 6, Protocadherin 17, Desmoglein2).

Neben den in Verbindung mit Pax und Src beschriebenen Zusammenhängen, gibt es weitere Arbeiten, die einen potentiellen Einfluss der IGF-Signaltransduktion auf die Zelladhäsion nahe legen. Durch die Bindung an den intrazellulären Teil verschiedener Cadherine vernetzt  $\beta$ -catenin diese über  $\alpha$ -catenin mit dem Aktin-Zytoskelett (203); dieser Proteinkomplex wird durch die IGF1R-induzierte Phosphorylierung der Cadherin-assoziierten Catenine zerstört (204). Dieses häufig bei der malignen Transformation zu beobachtende Phänomen, führt zu einer verminderten Zell-Zell-Adhäsion, verursacht durch die Relokalisation des Cadherins ins Zytoplasma (205).

Diese Arbeiten festigen die These, dass die Inhibierung der IGF-Signaltransduktion die Adhäsion von Tumorzellen beeinflussen kann und somit Invasions- und Migrationsfähigkeit von HCC-Zellen reduzieren kann. Um die Beteiligung der IGF-Achse an der Migration der Huh-7-Zellen nachzuweisen, müssen noch weitere funktionelle Tests erfolgen.

#### **4.4. Auswirkung der Inhibierungen auf die Genexpression**

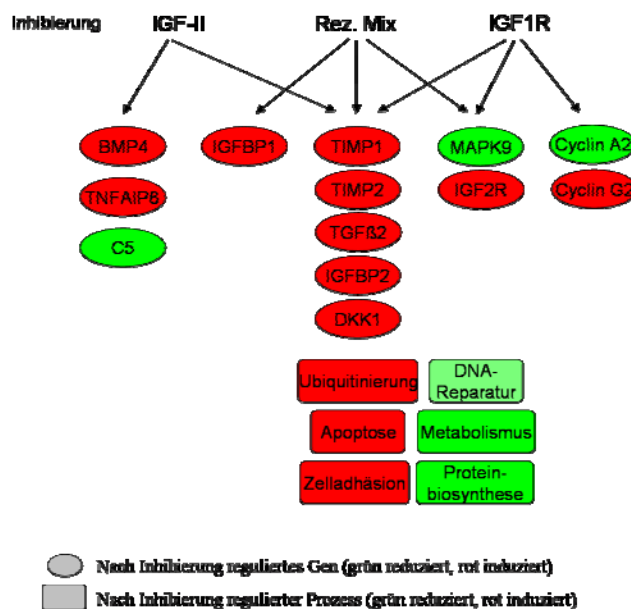
##### **4.4.1. Modifikation zellulärer Funktionsgruppen**

Im Gegensatz zur Veränderung Adhäsions-assoziiierter Moleküle, die nach IGF-II, IGF1R- wie auch nach kombinierter Rezeptorinhibierung beobachtet werden konnte, zeigten sich bei anderen zellulären Funktionsgruppen bereits bei der Expressions-Analyse Unterschiede zwischen der Liganden- und der Rezeptorinhibierung (Tabelle 5, Abbildung 33).

Die Reduktion des IGF1R oder beider Rezeptoren führte zu einer ausnahmslos verringerten Expression der an metabolischen Prozessen beteiligten Gene und einer überwiegenden Reduktion der in die Proteinbiosynthese involvierten Gene, während die IGF-II-Inhibierung auf diese Abläufe keinen Einfluss zeigte. Auch die vorwiegend supprimierende Wirkung durch die Rezeptorinhibierung auf die Expression der in die DNA-Reparatur involvierten Gene war nicht nach Reduktion des Liganden zu beobachten. Diese differentielle Modifikation zellulärer Prozesse nach siRNA-Inhibierung weist darauf hin, dass über die



Rezeptoren weitere, IGF-II-unabhängige Effekte vermittelt werden. Auch hier können alternative Liganden (z.B. IGF-I) die Faktoren darstellen, welche durch Bindung an den IGF1R die für die IGF-II-Inhibierung nicht zu beobachtbaren Effekte vermitteln.



**Abbildung 33: Auswahl regulierter zellulärer Funktionsgruppen und tumorrelevanter Gene**

Die Funktionsgruppen und tumorrelevanten Gene sind den Inhibierungen zugeordnet, durch die sie modifiziert wurden (Induktion rot, Reduktion grün). Die INSR-Inhibierung beeinflusst keine relevanten Gene oder Prozesse.

Die geringe Anzahl der regulierten Apoptose-assoziierten Gene, die ausnahmslos in ihrer Expression stimuliert vorlagen, lässt vermuten, dass die Apoptose-Regulation durch differentielle Genexpression in dem beobachteten Zeitfenster keine zentrale Funktion einnimmt. Darüber hinaus ist bekannt, dass die Aktivierung zahlreicher proapoptotischer Mechanismen nicht auf transkriptioneller Ebene, sondern über die proteolytische Spaltung Apoptose-relevanter Proteine erfolgt, die im Expressionsprofil nicht nachweisbar ist.

#### 4.4.2. Modulation potentiell tumorrelevanter Gene

Sowohl durch die IGF-II-Inhibierung wie auch die IGF1R- und kombinierte Rezeptorreduktion wurden unter anderem *Tissue Inhibitor of Metalloproteinase 1 und 2* (TIMP1 und TIMP2), *Transforming Growth Factor* (TGF)β2, *IGF-Binding Protein* (IGFBP)-2 und *Dickkopf* (DKK)1 in ihrer Expression induziert. Nach IGF1R- und/oder kombinierter Rezeptorinhibierung wurden unter anderem IGFBP-1, *Mitogen-activated Protein Kinase 9* (MAPK9), IGF Rezeptor Typ 2 (IGF2R), Cyclin A2 und Cyclin G2 differentiell exprimiert, während die Regulation von *Bone Morphogenic Protein* (BMP4), *Tumor Necrosis Factor alpha-induced Protein* (TNFAIP)8 und *Complement Component* (C5) exklusiv nach IGF-II-

Inhibierung erfolgte (zusammengefasst in Tabelle 6 und Abbildung 33). Einige der regulierten Gene sind Bestandteil des IGF-II Signalweges, weitere regulierte Gene beeinflussen Apoptose- und Proliferations-assoziierte Signalwege oder kontrollieren die Zellzyklusregulation.

Nachfolgend wird die Bedeutung und Funktion ausgewählter Gene innerhalb der IGF-Achse im Rahmen der Hepatokarzinogenese erörtert. Eine Übersicht über Funktion und Interaktionen aller Gene bieten Tabelle 7 und Abbildung 34.

Gen	Interaktion/Regulation	Literatur
TGF $\beta$ , IGFBP-1, IGFBP-2	Induktion von IGFBP durch TGF $\beta$	(206, 207)
TGF $\beta$ , TIMP1	TGF $\beta$ erhöht die TIMP1-Expression	(208)
DKK1, BMP4	Korrelation zwischen BMP4-induzierter Apoptose und DKK1 Expression in Mausembryonen	(209)
DKK1	inhibiert die WNT2-induzierte Proliferation und verhindert die $\beta$ -catenin Akkumulation im Kern	(210, 211)
Cyclin A2	Zellzyklusregulator, Kontrolle der DNA-Replikation	(212)
Cyclin G2	Überexpression supprimiert die Proliferation; Zielgen für FOXO Transkriptionsfaktoren, über PI3K reguliert	(213-215)
TIMP1, TIMP2	TIMPs inhibieren IGFBP-degradierende MMPs und verhindern so die Erhöhung der IGF-Bioverfügbarkeit; reduzieren Metastasierung durch Inhibierung der MMPs	(121, 216, 217)
IGF2R	vermittelt membranständig die IGF-II-Degradation; lösliche Form supprimiert die IGF-II-induzierte DNA-Synthese	(188, 218, 219)
TNFAIP8	mit MMP1-, MMP9- und VEGFR2 Expression assoziiert, wirkt antiapoptotisch und onkogen	(220)
JNK2 (codiert durch MAPK9)	degradiert c-jun und verhindert die Zellzyklusprogression und Proliferation	(221, 222)
BMP4	Ligand des TGF $\beta$ Signalwegs, reguliert so in Zellzyklus und Apoptose involvierte Gene, welche Zellzyklusarrest oder Apoptose vermitteln	(223-225)
IGFBP-1, IGFBP-2	reduzieren durch Bindung der IGFs ihre Bioverfügbarkeit und wirken daher antiproliferativ; liegen im HCC reduziert vor; besitzen ein RGD-Bindungsmotiv und stimulieren durch Bindung an den $\alpha_5\beta_1$ Integrin-Rezeptor Migration und Metastasierung und führen zum Verlust der Zelladhäsion	(226),(87, 123, 227-230)
C5	induziert Migration über ERK und PI3K Aktivierung; führt zu einer verzögerten Apoptose; in Leberfibrose und Leberregeneration involviert	(231), (232-235)

**Tabelle 7: Zusammenfassung funktioneller und mechanistischer Aspekte einer Auswahl nach Inhibierung dysregulierter Gene**

*Einfluss der Inhibierungen auf andere Signalwege und zelluläre Kontrollmechanismen*

BMP4 und TGF $\beta$ , beides Liganden des TGF $\beta$ -Signalweges, üben ebenso wie DKK1, ein sekretierter Inhibitor des Wnt-Signalweges, Einfluss auf andere Signalwege aus und wirken durch die Induktion antiproliferativer Prozesse antitumorigen. Ebenfalls antitumorigene Effekte können durch eine veränderte Expression von Zellzyklusregulatoren erzielt werden. Die exklusive Regulation des Cyclin A2 und des Cyclin G2 nach der Inhibierung des IGF1R weist auf biologische Effekte hin, die zwar über den IGF1R vermittelt, jedoch nicht durch IGF-II induziert werden. Das reduzierte Cyclin A2 ist ein proliferativ wirkender Zellzyklusregulator und spielt eine zentrale Rolle bei der Kontrolle der DNA-Replikation (212). Im Gegensatz dazu wirkt Cyclin G2, ein mögliches Zielgen der FOXO-Transkriptionsfaktoren (215), antiproliferativ.

Die funktionelle Zuordnung der regulierten Gene läßt darauf schließen, dass nach Inhibierung der IGF-Achse überwiegend antiproliferative und proapoptotische Auswirkungen besitzt.

*Einfluss der Inhibierung auf die Autoregulation des IGF-Signalweges*

Mit IGFBP-1 und IGFBP-2, IGF2R und den Proteaseinhibitoren TIMP1 und TIMP2 konnten zahlreiche Faktoren als IGF-II/IGF1R/INSR-abhängig identifiziert werden, die Einfluss auf die IGF-II-Bioverfügbarkeit ausüben können. Dies deutet auf autoregulative, durch die IGF-Signalachse hervorgerufene Prozesse hin, die sekundär die Aktivität des IGF-Signalweges modulieren und entsprechend der Signalstärke und der Art des Liganden justieren.

So bindet der IGF2R, welcher exklusiv nach der Inhibierung des IGF1R oder beider Rezeptoren induziert vorlag, IGF-II und führt es durch Internalisierung der lysosomalen Degradation zu (188). Außer der membranständigen Form gibt es darüber hinaus eine lösliche Form (218), die zirkulierendes IGF-II binden und inhibieren kann (219).

Die möglichen Folgen einer verstärkten Expression des IGFBP-1 und IGFBP-2, deren proteasomale Degradation durch TIMP-vermittelte Inhibierung der Proteasen verhindert werden kann (121), werden in der Literatur kontrovers diskutiert. Durch die Bindung des IGF-II reduzieren beide Proteine die Bioverfügbarkeit des Liganden. Übereinstimmend mit dieser Annahme konnte gezeigt werden, dass die Zugabe von IGFBP 1-4 zur humanen HCC-Zelllinie PLC zu einer signifikanten Reduktion der Zellproliferation führt (226). Dieser Zusammenhang wird durch Studien unterstützt, die signifikant reduziertes IGFBP-1 und IGFBP-2 in HCCs nachweisen (123, 227). Für IGFBP-1 wurde jedoch neben der phosphorylierten Form mit hoher Affinität zu den IGFs ein nicht phosphoryliertes Isoenzym

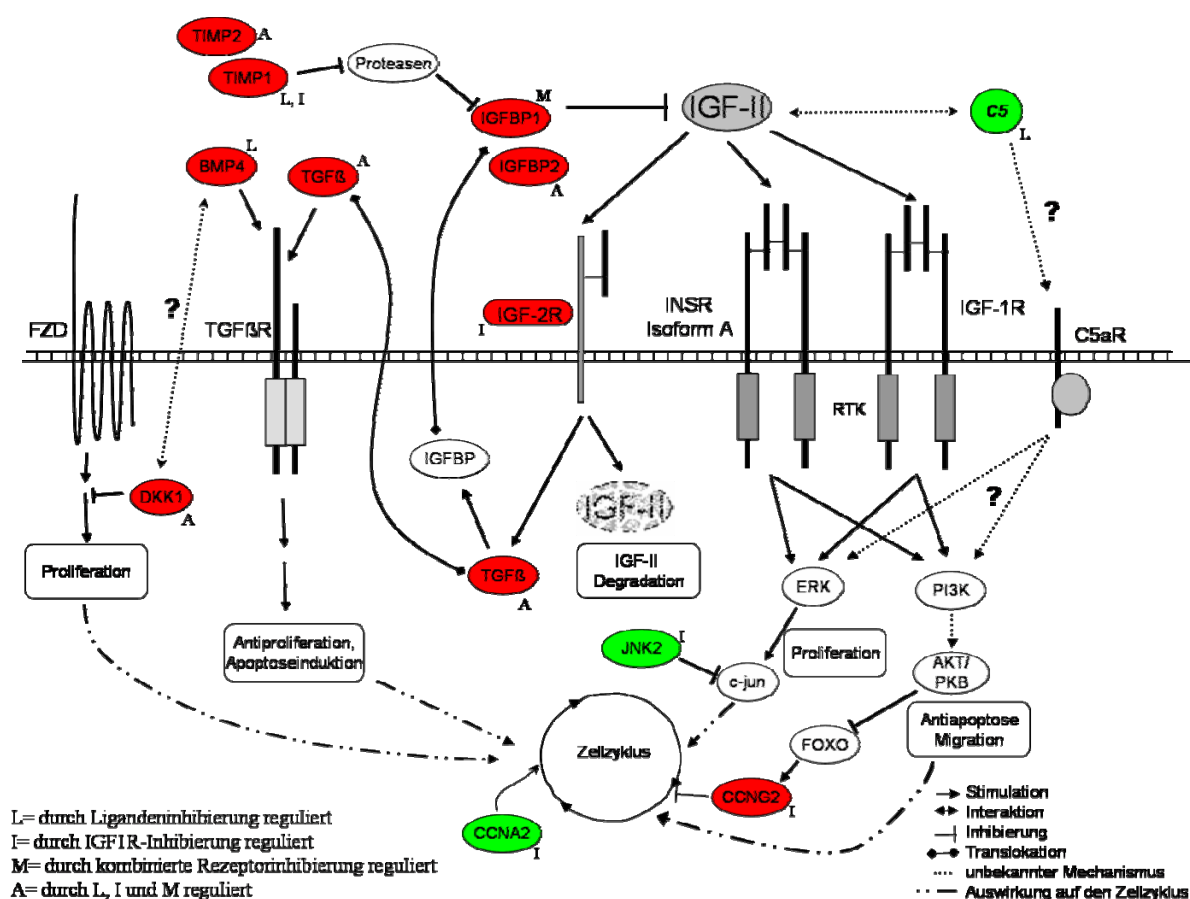
mit geringerer Bindungsaffinität beschrieben. Dieses bindet an den  $\alpha_5\beta_1$ Integrin-Rezeptor und stimuliert Zellmigration und Proliferation in HCC-Zellen (87, 228). Ähnliche Phosphorylierungszustände sind für das IGFBP-2 bisher nicht beschrieben worden. Die Bindung an den  $\alpha_5\beta_1$ Integrin-Rezeptor konnte aber auch für IGFBP-2 in verschiedenen Zelllinien nachgewiesen werden, wodurch es zu einer Reduktion der FAK-Phosphorylierung und damit einhergehend zu einem Verlust der Zelladhäsion kommt (229, 230).

Diese Daten belegen, dass die Aktivierung der IGF-Signalkaskade eine Reduktion IGF-II-inhibierender oder –reduzierender Faktoren wie den IGFBPs und dem IGF2R bewirkt. Dadurch könnte die Konzentration bioaktiven IGF-II erhöht werden und zu einer verstärkten Rezeptorstimulation führen. Die hier durchgeführte Inhibierung der IGF-Achse führt zur erhöhten Expression dieser Faktoren und könnte somit zu einer weiteren Inhibierung des Signalweges führen.

#### *Spezifischer Einfluss der IGF-II-Inhibierung*

Neben BMP4 und TNFAIP8 wird das Anaphylatoxin C5, Mitglied des membranangreifenden Komplexes des Komplementsystems, welches Bestandteil des nativen Immunsystems ist, exklusiv durch die IGF-II Inhibierung reguliert. Arbeiten in verschiedenen Zelllinien konnten eine mechanistische Verbindung des C5-Poteins zu intrazellulären Kinasen aufzeigen. So sind für die C5 induzierte Migration ERK1/2, PI3K und p38 MAPK erforderlich (231), die C5-vermittelte Aktivierung selbiger Kinasen führt zudem zu einer verzögerten Apoptose (232, 233). In der murinen und humanen Leber spielt C5 bei der Bildung der hepatischen Fibrose eine Rolle (236, 237). Mäuse mit C5-Defizienz besitzen aufgrund fehlender Stimulation des C5a-Rezeptors eine stark verzögerte Fibrogenese sowie eine fehlerhafte Leberregeneration (234, 235).

Ein mechanistischer Zusammenhang zwischen IGF-II und C5, wie ihn die Array-Daten vermuten lassen, wurde bisher nicht beschrieben. Es ist jedoch vorstellbar, dass durch die IGF-II-abhängige Aktivierung des C5 die proproliferativen und antiapoptotischen Signalkaskaden durch einen positiven Feedback-Loop verstärkt werden.



**Abbildung 34: Ausgewählte Funktionen und Interaktionen ausgewählter, durch die Inhibierung regulierter Gene**

Einige der Gene, die durch die Inhibierung der verschiedenen IGF-Signalkomponenten reguliert vorlagen, sind in diesem Schaubild zusammengefasst. Neben der Funktion, und der Regulation (grün: reduziert, rot: induziert) sind auch in der Literatur beschriebene Interaktionen dargestellt.

#### 4.5. Die IGF-Achse als therapeutische Zielstruktur

Die Daten dieser Arbeit und der diskutierten publizierten Ergebnisse identifizieren den IGF-II Signalweg als eine zentrale protumorigene Signalkaskade. Insbesondere die Identifikation des in einer Subpopulation von HCCs stark überexprimierten IGF-II (131, 132) deutet darauf hin, dass die Signalkomponenten der IGF-Achse potentielle therapeutische Zielstrukturen darstellen können. Dieser Ansatz wurde bisher mit Hilfe verschiedener Methoden und Techniken in unterschiedlichen *in vitro* und *in vivo* Modellsystemen aufgegriffen. Neben der Inhibierung mit spezifischen Antikörpern (185, 238), dominant negativen Rezeptoren (239-241) und Rezeptor-spezifischen Tyrosinkinase-Inhibitoren (242-244), sind es vor allem *antisense* Oligonukleotidansätze, die eine gerichtete und spezifische Aktivitätsreduktion des Signalweges ermöglichen sollen (245, 246).

Obwohl für viele experimentelle Systeme erfolgreich durchgeführt (247, 248), existieren doch maßgebliche Nachteile und Unzulänglichkeiten, die eine Anwendung dieser Methoden in der Therapie fragwürdig erscheinen lassen:

- Die spezifische Inhibierung des IGF1R in der HCC-Therapie (z.B. durch spezifische Antikörper) ist nicht ausreichend. IGF-II kann alternativ seine proliferativen und antiapoptotischen Effekte über den INSR Isoform A vermitteln.
- Eine Differenzierung der durch verschiedene Liganden induzierten Signale ist nicht möglich. Eine Blockade des IGF1R (z.B. durch Tyrosinkinaseinhibitoren) unterdrückt somit weitere, möglicherweise für die Homöostase nicht tumoröser Zellen essentielle Effekte (z.B. durch IGF-I).
- Eine zusätzliche Blockade des INSR ist, aufgrund der hohen Homologie der beiden Rezeptoren, eine häufige Nebenwirkung IGF1R-selektiver Inhibitoren, gleichzeitig aber essentiell für eine erfolgreiche Blockade der IGF-II-Signale. Diese Inhibierung kann zu diabetogenen Effekten führen, da der INSR ein zentraler Bestandteil des Glukosemetabolismus ist.
- Die Anwendung von IGF-II-spezifischen inhibitorischen Antikörpern hat sich aufgrund geringer Zugänglichkeit der Proteine in soliden Tumoren als nicht immer praktikabel erwiesen.

Aufgrund dieser Erkenntnisse ist die spezifische Inhibierung des Wachstumsfaktors IGF-II ein optimaler Ansatz für eine gezielte HCC-Therapie der IGF-II-überexprimierenden Subgruppe. Durch die spezifische Inhibierung des IGF-II wird nicht die Signaltransduktion anderer Liganden beeinträchtigt, eine Blockade essentieller Rezeptoren ist nicht erforderlich und die Inhibierung durch siRNA ist im Vergleich zu *antisense* Oligonukleotiden deutlich effizienter.

Diese Schlussfolgerungen wurden durch experimentelle Daten belegt, die zeigen dass eine Sensitivierung der Tumorzellen gegen zytostatische Stimuli nach IGF-II-Inhibierung erfolgt. Die kombinierte Behandlung von HCC-Zellen mit IGF-II-spezifischer siRNA und Celecoxib bewirkte superadditive Effekte hinsichtlich des Vitalitätsverlusts der Zellen. Durch die Behandlung der Zellen mit Celecoxib kam es außerdem zu einer Reduktion der IGF1R-Expression, die auch in verschiedenen Kolonkrebs-Zelllinien nachgewiesen werden konnte (249). Neben diesem direkten Einfluss des Celecoxib auf die Signalkaskade, können weitere

biologische Effekte des Celecoxib wie die Reduktion des proliferationsfördernden  $\text{PGE}_2$  zu dieser Vitalitätsreduktion beitragen (46).

Diese sich verstärkende Wirkung konnte durch eine IGF-II-Reduktion mit zusätzlicher Cisplatin-Behandlung nicht erzielt werden, obwohl publizierte Daten belegen, dass die Inhibierung des ERK-Signalweges, die wir in unserem Modell nach IGF-II-Reduktion nachweisen konnten, zu einer gesteigerten Sensitivität verschiedener Tumorzellen gegenüber Cisplatin führt (250, 251). Der Grund für diese konträren Ergebnisse kann darauf beruhen, dass in allen Experimenten mit siRNA vermittelter IGF-II-Inhibierung und der Behandlung mit Celecoxib und Cisplatin immer sehr geringe (subtoxische oder zytostatische) Konzentrationen eingesetzt wurden. Höhere Konzentrationen hätten in diesem Modell vielleicht zu deutlicheren biologischen Effekten geführt.

#### **4.5.1. Ausblick**

Aufgrund der vorgestellten Effekte der IGF-II-Inhibierung und der ersten Ergebnisse in Kombination mit zytotoxischen Wirkstoffen, scheint IGF-II eine viel versprechende Zielstruktur für neue therapeutische Strategien darzustellen. Weitere Experimente mit anderen Konzentrationen und zusätzlichen Wirkstoffen und funktionellen Analysen müssen durchgeführt werden, um das Potential der IGF-II-Inhibierung und der daraus resultierenden Sensibilisierung gegen proapoptotische Stimuli ausschöpfen zu können. Außerdem werden ausgewählte, durch die Expressions-Analysen beschriebene Gene und Funktionsgruppen hinsichtlich ihrer Bedeutung für die IGF-II-abhängige Hepatokarzinogenese detailliert untersucht werden (z.B. Migration und Zelladhäsion mittels Scratch-Test, C5 als positiver Feedback Effektor).

## 5. Zusammenfassung

Der Wachstumsfaktor *insulin-like growth factor* (IGF)-II wird in einer Subgruppe humaner hepatozellulärer Karzinome (*hepatocellular carcinoma*, HCC), eine der häufigsten humanen Tumorerkrankungen mit schlechter Prognose und wenigen Therapieoptionen, stark überexprimiert. Aufgrund ihrer protumorigenen Wirkung stellen der Ligand und die signaltransduzierenden Rezeptoren potentielle therapeutische Zielstrukturen dar. Im Rahmen dieser Arbeit wurden an HCC-Zellen mit hoher IGF-II-Expression die Funktion und Relevanz von IGF-II und den signaltransduzierenden Rezeptoren, Insulin-Rezeptor (INSR) und IGF1-Rezeptor (IGF1R), mittels genspezifischer Inhibierung (*RNAinterference*) analysiert.

Während die Inhibierung des INSR keinen Einfluss auf Proliferation, Apoptose und Zellvitalität zeigte, führten die Reduktion des IGF1R, die gleichzeitige Reduktion des INSR und IGF1R und die IGF-II-Inhibierung zu einer signifikanten Vitalitäts- und Proliferationsreduktion so wie zu einer signifikant gesteigerten Apoptose in HCC-Zellen. Anhand der Phosphorylierungsmodifikation von zytoplasmatischen Signalwegskomponenten (z.B. Erk, AKT/PKB) wurde deutlich, dass der IGF1R die IGF-II-Effekte vermittelt, diese aber nach Inhibierung des IGF1R alternativ über den INSR transduziert werden können. Ferner deuten die Ergebnisse darauf hin, dass definierte Effektoren besonders durch die exklusive Inhibierung von IGF-II sowohl in ihrer Expression (z.B. C5) als auch in ihrer Aktivität (z.B. Pax) beeinflusst werden. Die Analyse der Expressionsdaten nach Inhibierung von IGF-II, INSR und IGF1R zeigt, dass die IGF-Signalachse in metabolische Prozesse, Proliferation, Apoptose, DNA-Replikation und DNA-Reparatur wie auch in die Proteinbiosynthese involviert ist. Sowohl diese Expressionsdaten wie auch die spezifische Aktivierung von Faktoren die in die Zelladhäsion involviert sind (z.B. Pax, Src), deuten auf eine Rolle der IGF-II-Signaltransduktion in der Modulation dieses Prozesses hin. Die Funktionsgruppen der DNA-Reparatur, des Metabolismus und der Proteinbiosynthese werden jedoch nicht durch die IGF-II-Inhibierung in ihrer Expression modifiziert. Diese Daten verdeutlichen, dass maßgebliche funktionelle Unterschiede zwischen den verschiedenen IGF-Signalwegskomponenten existieren. Der spezifischste Ansatz für potentielle therapeutische Nutzung ist deshalb die direkte Inhibierung des IGF-II, da sowohl diabetogene Effekte umgangen werden, andere z.T. essentielle Signalkaskaden (z.B. durch IGF-I) nicht in ihrer Aktivität beeinträchtigt werden und gleichzeitig eine vollständige Inhibierung der IGF-II-vermittelten protumorigenen Effekte unabhängig vom signaltransduzierenden Rezeptor erfolgt. In ersten Experimenten wurde gezeigt, dass eine Kombinationsbehandlung von HCC-



Zellen mit IGF-II-spezifischer siRNA und dem Antirheumatikum Celecoxib zu superadditive Effekten bezüglich des Vitalitätsverlustes führt.

## 6. Literatur

1. El-Serag, H. B. Hepatocellular carcinoma: an epidemiologic view. *J Clin Gastroenterol*, 35: S72-78., 2002.
2. Feitelson, M. A., Sun, B., Satiroglu Tufan, N. L., Liu, J., Pan, J., and Lian, Z. Genetic mechanisms of hepatocarcinogenesis. *Oncogene*, 21: 2593-2604, 2002.
3. Beasley, R. P. and Hwang, L. Y. Hepatocellular carcinoma and hepatitis B virus. *Semin Liver Dis*, 4: 113-121, 1984.
4. McGlynn, K. A., Tsao, L., Hsing, A. W., Devesa, S. S., and Fraumeni, J. F., Jr. International trends and patterns of primary liver cancer. *Int J Cancer*, 94: 290-296, 2001.
5. Chen, C. J., Yu, M. W., and Liaw, Y. F. Epidemiological characteristics and risk factors of hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol*, 12: S294-308, 1997.
6. Thorgeirsson, S. S. and Grisham, J. W. Molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma. *Nat Genet*, 31: 339-346., 2002.
7. Beasley, R. P., Hwang, L. Y., Lin, C. C., and Chien, C. S. Hepatocellular carcinoma and hepatitis B virus. A prospective study of 22 707 men in Taiwan. *Lancet*, 2: 1129-1133, 1981.
8. Caselmann, W. H., Serwe, M., Lehmann, T., Ludwig, J., Sproat, B. S., and Engels, J. W. Design, delivery and efficacy testing of therapeutic nucleic acids used to inhibit hepatitis C virus gene expression in vitro and in vivo. *World J Gastroenterol*, 6: 626-629, 2000.
9. Di Bisceglie, A. M. Hepatitis C and hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 26: 34S-38S, 1997.
10. Chang, M. H., Chen, C. J., Lai, M. S., Hsu, H. M., Wu, T. C., Kong, M. S., Liang, D. C., Shau, W. Y., and Chen, D. S. Universal hepatitis B vaccination in Taiwan and the incidence of hepatocellular carcinoma in children. Taiwan Childhood Hepatoma Study Group. *N Engl J Med*, 336: 1855-1859, 1997.
11. Kubicka, S., Rudolph, K. L., Hanke, M., Tietze, M. K., Tillmann, H. L., Trautwein, C., and Manns, M. Hepatocellular carcinoma in Germany: a retrospective epidemiological study from a low-endemic area. *Liver*, 20: 312-318, 2000.
12. El-Serag, H. B. and Mason, A. C. Risk factors for the rising rates of primary liver cancer in the United States. *Arch Intern Med*, 160: 3227-3230, 2000.
13. Okuda, K. Hepatocellular carcinoma. *J Hepatol*, 32: 225-237, 2000.
14. Taylor-Robinson, S. D., Foster, G. R., Arora, S., Hargreaves, S., and Thomas, H. C. Increase in primary liver cancer in the UK, 1979-94. *Lancet*, 350: 1142-1143, 1997.
15. Kondoh, N., Wakatsuki, T., Hada, A., Shuda, M., Tanaka, K., Arai, M., and Yamamoto, M. Genetic and epigenetic events in human hepatocarcinogenesis. *Int J Oncol*, 18: 1271-1278., 2001.
16. Deuffic, S., Poynard, T., Buffat, L., and Valleron, A. J. Trends in primary liver cancer. *Lancet*, 351: 214-215, 1998.
17. Van Rensburg, S. J., Cook-Mozaffari, P., Van Schalkwyk, D. J., Van der Watt, J. J., Vincent, T. J., and Purchase, I. F. Hepatocellular carcinoma and dietary aflatoxin in Mozambique and Transkei. *Br J Cancer*, 51: 713-726, 1985.
18. Henry, S. H., Bosch, F. X., Troxell, T. C., and Bolger, P. M. Policy forum: public health. Reducing liver cancer--global control of aflatoxin. *Science*, 286: 2453-2454, 1999.
19. Okuda, K. Hepatocellular carcinoma: recent progress. *Hepatology*, 15: 948-963, 1992.
20. Ikeda, K., Saitoh, S., Koida, I., Arase, Y., Tsubota, A., Chayama, K., Kumada, H., and Kawanishi, M. A multivariate analysis of risk factors for hepatocellular

- carcinogenesis: a prospective observation of 795 patients with viral and alcoholic cirrhosis. *Hepatology*, 18: 47-53, 1993.
21. Caselmann, W. H., Meyer, M., Kekule, A. S., Lauer, U., Hofschneider, P. H., and Koshy, R. A trans-activator function is generated by integration of hepatitis B virus preS/S sequences in human hepatocellular carcinoma DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87: 2970-2974, 1990.
  22. Kern, M. A., Breuhahn, K., and Schirmacher, P. Molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma. *Adv Cancer Res*, 86: 67-112., 2002.
  23. Hirohashi, S., Ishak, K.G., Kojiro, M., Wanless, I.R., Theise, N.D., Tsukuma, H., Blum, H.E., Deugnier, Y., Laurent Puig, P., Fischer, H.P., and Sakamoto, M. Hepatocellular Carcinoma. *In: In "Pathology&Genetics. Tumors of the Digestive System" (S.T Hamilton and L.A. Aaltonen, Eds.), pp. 159-180: WHO, Geneva, 2000.*
  24. Terminology of nodular hepatocellular lesions. International Working Party. *Hepatology*, 22: 983-993, 1995.
  25. Kondo, Y. Pathology of early hepatocellular carcinoma and preneoplastic lesions in the liver. *In: "Liver Cancer" (K. Okud and E. Tabor, Eds.), pp. 135-154. New York: Churchill Livingstone, 1997.*
  26. Durr, R. and Caselmann, W. H. Carcinogenesis of primary liver malignancies. *Langenbecks Arch Surg*, 385: 154-161, 2000.
  27. Moinzadeh, P., Breuhahn, K., Stutzer, H., and Schirmacher, P. Chromosome alterations in human hepatocellular carcinomas correlate with aetiology and histological grade--results of an explorative CGH meta-analysis. *Br J Cancer*, 92: 935-941, 2005.
  28. Zondervan, P. E., Wink, J., Alers, J. C., JN, I. J., Schalm, S. W., de Man, R. A., and van Dekken, H. Molecular cytogenetic evaluation of virus-associated and non-viral hepatocellular carcinoma: analysis of 26 carcinomas and 12 concurrent dysplasias. *J Pathol*, 192: 207-215., 2000.
  29. Qin, L. X., Tang, Z. Y., Sham, J. S., Ma, Z. C., Ye, S. L., Zhou, X. D., Wu, Z. Q., Trent, J. M., and Guan, X. Y. The association of chromosome 8p deletion and tumor metastasis in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Res*, 59: 5662-5665, 1999.
  30. Friend, S. H., Bernards, R., Rogelj, S., Weinberg, R. A., Rapaport, J. M., Albert, D. M., and Dryja, T. P. A human DNA segment with properties of the gene that predisposes to retinoblastoma and osteosarcoma. *Nature*, 323: 643-646, 1986.
  31. Zhang, X., Xu, H. J., Murakami, Y., Sachse, R., Yashima, K., Hirohashi, S., Hu, S. X., Benedict, W. F., and Sekiya, T. Deletions of chromosome 13q, mutations in Retinoblastoma 1, and retinoblastoma protein state in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Res*, 54: 4177-4182, 1994.
  32. Chen, T. C., Hsieh, L. L., Kuo, T. T., Ng, K. F., Wu Chou, Y. H., Jeng, L. B., and Chen, M. F. p16INK4 gene mutation and allelic loss of chromosome 9p21-22 in Taiwanese hepatocellular carcinoma. *Anticancer Res*, 20: 1621-1626, 2000.
  33. Levine, A. J. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell*, 88: 323-331., 1997.
  34. Sheikh, M. S. and Fornace, A. J., Jr. Role of p53 family members in apoptosis. *J Cell Physiol*, 182: 171-181., 2000.
  35. Nishida, N., Fukuda, Y., Kokuryu, H., Toguchida, J., Yandell, D. W., Ikenaga, M., Imura, H., and Ishizaki, K. Role and mutational heterogeneity of the p53 gene in hepatocellular carcinoma. *Cancer Res*, 53: 368-372., 1993.
  36. Thomas, M., Matlashewski, G., Pim, D., and Banks, L. Induction of apoptosis by p53 is independent of its oligomeric state and can be abolished by HPV-18 E6 through ubiquitin mediated degradation. *Oncogene*, 13: 265-273., 1996.

37. Feitelson, M. A. Hepatitis B x antigen and p53 in the development of hepatocellular carcinoma. *J Hepatobiliary Pancreat Surg*, 5: 367-374., 1998.
38. Ozturk, M. Genetic aspects of hepatocellular carcinogenesis. *Semin Liver Dis*, 19: 235-242., 1999.
39. Hayashi, H., Sugio, K., Matsumata, T., Adachi, E., Takenaka, K., and Sugimachi, K. The clinical significance of p53 gene mutation in hepatocellular carcinomas from Japan. *Hepatology*, 22: 1702-1707., 1995.
40. Itoh, T., Shiro, T., Seki, T., Nakagawa, T., Wakabayashi, M., Inoue, K., and Okamura, A. Relationship between p53 overexpression and the proliferative activity in hepatocellular carcinoma. *Int J Mol Med*, 6: 137-142., 2000.
41. Qiu, S. J., Ye, S. L., Wu, Z. Q., Tang, Z. Y., and Liu, Y. K. The expression of the mdm2 gene may be related to the aberration of the p53 gene in human hepatocellular carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol*, 124: 253-258., 1998.
42. Nishida, N., Fukuda, Y., Komeda, T., Kita, R., Sando, T., Furukawa, M., Amenomori, M., Shibagaki, I., Nakao, K., Ikenaga, M., and et al. Amplification and overexpression of the cyclin D1 gene in aggressive human hepatocellular carcinoma. *Cancer Res*, 54: 3107-3110., 1994.
43. Zhou, L., An, N., Haydon, R. C., Zhou, Q., Cheng, H., Peng, Y., Jiang, W., Luu, H. H., Vanichakarn, P., Szatkowski, J. P., Park, J. Y., Breyer, B., and He, T. C. Tyrosine kinase inhibitor STI-571/Gleevec down-regulates the beta-catenin signaling activity. *Cancer Lett*, 193: 161-170, 2003.
44. Fosslien, E. Biochemistry of cyclooxygenase (COX)-2 inhibitors and molecular pathology of COX-2 in neoplasia. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 37: 431-502, 2000.
45. Dempke, W., Rie, C., Grothey, A., and Schmoll, H. J. Cyclooxygenase-2: a novel target for cancer chemotherapy? *J Cancer Res Clin Oncol*, 127: 411-417, 2001.
46. Kern, M. A., Schubert, D., Sahi, D., Schoneweiss, M. M., Moll, I., Haugg, A. M., Dienes, H. P., Breuhahn, K., and Schirmacher, P. Proapoptotic and antiproliferative potential of selective cyclooxygenase-2 inhibitors in human liver tumor cells. *Hepatology*, 36: 885-894., 2002.
47. Bae, S. H., Jung, E. S., Park, Y. M., Kim, B. S., Kim, B. K., Kim, D. G., and Ryu, W. S. Expression of cyclooxygenase-2 (COX-2) in hepatocellular carcinoma and growth inhibition of hepatoma cell lines by a COX-2 inhibitor, NS-398. *Clin Cancer Res*, 7: 1410-1418, 2001.
48. Niketeghad, F., Decker, H. J., Caselmann, W. H., Lund, P., Geissler, F., Dienes, H. P., and Schirmacher, P. Frequent genomic imbalances suggest commonly altered tumour genes in human hepatocarcinogenesis. *Br J Cancer*, 85: 697-704., 2001.
49. Wodarz, A. and Nusse, R. Mechanisms of Wnt signaling in development. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 14: 59-88, 1998.
50. Buendia, M. A. Genetics of hepatocellular carcinoma. *Semin Cancer Biol*, 10: 185-200., 2000.
51. Polakis, P. Wnt signaling and cancer. *Genes Dev*, 14: 1837-1851., 2000.
52. Levine, A. J., Momand, J., and Finlay, C. A. The p53 tumour suppressor gene. *Nature*, 351: 453-456, 1991.
53. Hsu, H. C., Jeng, Y. M., Mao, T. L., Chu, J. S., Lai, P. L., and Peng, S. Y. Beta-catenin mutations are associated with a subset of low-stage hepatocellular carcinoma negative for hepatitis B virus and with favorable prognosis. *Am J Pathol*, 157: 763-770., 2000.
54. Nhieu, J. T., Renard, C. A., Wei, Y., Cherqui, D., Zafrani, E. S., and Buendia, M. A. Nuclear accumulation of mutated beta-catenin in hepatocellular carcinoma is associated with increased cell proliferation. *Am J Pathol*, 155: 703-710., 1999.

55. Prange, W., Breuhahn, K., Fischer, F., Zilkens, C., Pietsch, T., Petmecky, K., Eilers, R., Dienes, H. P., and Schirmacher, P. Beta-catenin accumulation in the progression of human hepatocarcinogenesis correlates with loss of E-cadherin and accumulation of p53, but not with expression of conventional WNT-1 target genes. *J Pathol*, 201: 250-259., 2003.
56. Wong, C. M., Fan, S. T., and Ng, I. O. beta-Catenin mutation and overexpression in hepatocellular carcinoma: clinicopathologic and prognostic significance. *Cancer*, 92: 136-145., 2001.
57. Taniguchi, K., Roberts, L. R., Aderca, I. N., Dong, X., Qian, C., Murphy, L. M., Nagorney, D. M., Burgart, L. J., Roche, P. C., Smith, D. I., Ross, J. A., and Liu, W. Mutational spectrum of beta-catenin, AXIN1, and AXIN2 in hepatocellular carcinomas and hepatoblastomas. *Oncogene*, 21: 4863-4871., 2002.
58. Massague, J. TGF-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem*, 67: 753-791., 1998.
59. Feng, X. H., Zhang, Y., Wu, R. Y., and Derynck, R. The tumor suppressor Smad4/DPC4 and transcriptional adaptor CBP/p300 are coactivators for smad3 in TGF-beta-induced transcriptional activation. *Genes Dev*, 12: 2153-2163, 1998.
60. Kavsak, P., Rasmussen, R. K., Causing, C. G., Bonni, S., Zhu, H., Thomsen, G. H., and Wrana, J. L. Smad7 binds to Smurf2 to form an E3 ubiquitin ligase that targets the TGF beta receptor for degradation. *Mol Cell*, 6: 1365-1375, 2000.
61. Kawate, S., Fukusato, T., Ohwada, S., Watanuki, A., and Morishita, Y. Amplification of c-myc in hepatocellular carcinoma: correlation with clinicopathologic features, proliferative activity and p53 overexpression. *Oncology*, 57: 157-163., 1999.
62. Gotzmann, J., Huber, H., Thallinger, C., Wolschek, M., Jansen, B., Schulte-Hermann, R., Beug, H., and Mikulits, W. Hepatocytes convert to a fibroblastoid phenotype through the cooperation of TGF-beta1 and Ha-Ras: steps towards invasiveness. *J Cell Sci*, 115: 1189-1202, 2002.
63. Efimova, E. A., Glanemann, M., Liu, L., Schumacher, G., Settmacher, U., Jonas, S., Langrehr, J. M., Neuhaus, P., and Nussler, A. K. Effects of human hepatocyte growth factor on the proliferation of human hepatocytes and hepatocellular carcinoma cell lines. *Eur Surg Res*, 36: 300-307, 2004.
64. Monvoisin, A., Neaud, V., De Ledinghen, V., Dubuisson, L., Balabaud, C., Bioulac-Sage, P., Desmouliere, A., and Rosenbaum, J. Direct evidence that hepatocyte growth factor-induced invasion of hepatocellular carcinoma cells is mediated by urokinase. *J Hepatol*, 30: 511-518, 1999.
65. Suzuki, A., Hayashida, M., Kawano, H., Sugimoto, K., Nakano, T., and Shiraki, K. Hepatocyte growth factor promotes cell survival from fas-mediated cell death in hepatocellular carcinoma cells via Akt activation and Fas-death-inducing signaling complex suppression. *Hepatology*, 32: 796-802, 2000.
66. Schmidt, C., Bladt, F., Goedecke, S., Brinkmann, V., Zschiesche, W., Sharpe, M., Gherardi, E., and Birchmeier, C. Scatter factor/hepatocyte growth factor is essential for liver development. *Nature*, 373: 699-702., 1995.
67. Stuart, K. A., Riordan, S. M., Lidder, S., Crostella, L., Williams, R., and Skouteris, G. G. Hepatocyte growth factor/scatter factor-induced intracellular signalling. *Int J Exp Pathol*, 81: 17-30, 2000.
68. Kiss, A., Wang, N. J., Xie, J. P., and Thorgeirsson, S. S. Analysis of transforming growth factor (TGF)-alpha/epidermal growth factor receptor, hepatocyte growth Factor/c-met, TGF-beta receptor type II, and p53 expression in human hepatocellular carcinomas. *Clin Cancer Res*, 3: 1059-1066, 1997.
69. D'Errico, A., Fiorentino, M., Ponzetto, A., Daikuhara, Y., Tsubouchi, H., Brechot, C., Scoazec, J. Y., and Grigioni, W. F. Liver hepatocyte growth factor does not always

- correlate with hepatocellular proliferation in human liver lesions: its specific receptor c-met does. *Hepatology*, 24: 60-64, 1996.
70. Guirouilh, J., Castroviejo, M., Balabaud, C., Desmouliere, A., and Rosenbaum, J. Hepatocarcinoma cells stimulate hepatocyte growth factor secretion in human liver myofibroblasts. *Int J Oncol*, 17: 777-781, 2000.
  71. Guirouilh, J., Le Bail, B., Boussarie, L., Balabaud, C., Bioulac-Sage, P., Desmouliere, A., Schuppan, D., and Rosenbaum, J. Expression of hepatocyte growth factor in human hepatocellular carcinoma. *J Hepatol*, 34: 78-83, 2001.
  72. Rinderknecht, E. and Humbel, R. E. Primary structure of human insulin-like growth factor II. *FEBS Lett*, 89: 283-286, 1978.
  73. Rinderknecht, E. and Humbel, R. E. The amino acid sequence of human insulin-like growth factor I and its structural homology with proinsulin. *J Biol Chem*, 253: 2769-2776, 1978.
  74. Scott, C. D., Martin, J. L., and Baxter, R. C. Production of insulin-like growth factor I and its binding protein by adult rat hepatocytes in primary culture. *Endocrinology*, 116: 1094-1101, 1985.
  75. Scharf, J. G., Knittel, T., Dombrowski, F., Muller, L., Saile, B., Bräulke, T., Hartmann, H., and Ramadori, G. Characterization of the IGF axis components in isolated rat hepatic stellate cells. *Hepatology*, 27: 1275-1284, 1998.
  76. Vu, T. H. and Hoffman, A. R. Promoter-specific imprinting of the human insulin-like growth factor-II gene. *Nature*, 371: 714-717, 1994.
  77. Drummond, I. A., Madden, S. L., Rohwer-Nutter, P., Bell, G. I., Sukhatme, V. P., and Rauscher, F. J., 3rd Repression of the insulin-like growth factor II gene by the Wilms tumor suppressor WT1. *Science*, 257: 674-678, 1992.
  78. Sussenbach, J. S., Steenbergh, P. H., and Holthuisen, P. Structure and expression of the human insulin-like growth factor genes. *Growth Regul*, 2: 1-9, 1992.
  79. Arney, K. L. H19 and Igf2--enhancing the confusion? *Trends Genet*, 19: 17-23, 2003.
  80. Kalscheuer, V. M., Mariman, E. C., Schepens, M. T., Rehder, H., and Ropers, H. H. The insulin-like growth factor type-2 receptor gene is imprinted in the mouse but not in humans. *Nat Genet*, 5: 74-78, 1993.
  81. Ekstrom, T. J., Cui, H., Nystrom, A., Rutanen, E. M., and Ohlsson, R. Monoallelic expression of IGF2 at the human fetal/maternal boundary. *Mol Reprod Dev*, 41: 177-183, 1995.
  82. Nielsen, F. C. and Christiansen, J. Posttranscriptional regulation of insulin-like growth factor II mRNA. *Scand J Clin Lab Invest Suppl*, 220: 37-46, 1995.
  83. Firth, S. M. and Baxter, R. C. Cellular actions of the insulin-like growth factor binding proteins. *Endocr Rev*, 23: 824-854, 2002.
  84. Huynh, H., Chow, P. K., Ooi, L. L., and Soo, K. C. A possible role for insulin-like growth factor-binding protein-3 autocrine/paracrine loops in controlling hepatocellular carcinoma cell proliferation. *Cell Growth Differ*, 13: 115-122, 2002.
  85. Lalou, C., Lassarre, C., and Binoux, M. A proteolytic fragment of insulin-like growth factor (IGF) binding protein-3 that fails to bind IGF is a cell growth inhibitor. *Prog Growth Factor Res*, 6: 311-316, 1995.
  86. Boisclair, Y. R., Hurst, K. R., Ueki, I., Tremblay, M. L., and Ooi, G. T. Regulation and role of the acid-labile subunit of the 150-kilodalton insulin-like growth factor complex in the mouse. *Pediatr Nephrol*, 14: 562-566, 2000.
  87. Jones, J. I. and Clemmons, D. R. Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocr Rev*, 16: 3-34, 1995.
  88. Brouillet, J. P., Hanslick, B., Maudelonde, T., Pivat, M. T., Grenier, J., Blanc, F., and Rochefort, H. Increased plasma cathepsin D concentration in hepatic carcinoma and cirrhosis but not in breast cancer. *Clin Biochem*, 24: 491-496, 1991.

- 
89. Maile, L. A. and Holly, J. M. Insulin-like growth factor binding protein (IGFBP) proteolysis: occurrence, identification, role and regulation. *Growth Horm IGF Res*, 9: 85-95, 1999.
  90. Zwad, O., Kubler, B., Roth, W., Scharf, J. G., Saftig, P., Peters, C., and Braulke, T. Decreased intracellular degradation of insulin-like growth factor binding protein-3 in cathepsin L-deficient fibroblasts. *FEBS Lett*, 510: 211-215, 2002.
  91. Cohen, P., Graves, H. C., Peehl, D. M., Kamarei, M., Giudice, L. C., and Rosenfeld, R. G. Prostate-specific antigen (PSA) is an insulin-like growth factor binding protein-3 protease found in seminal plasma. *J Clin Endocrinol Metab*, 75: 1046-1053, 1992.
  92. Wang, Z. Q., Fung, M. R., Barlow, D. P., and Wagner, E. F. Regulation of embryonic growth and lysosomal targeting by the imprinted *Igf2/Mpr* gene. *Nature*, 372: 464-467, 1994.
  93. Braulke, T. Type-2 IGF receptor: a multi-ligand binding protein. *Horm Metab Res*, 31: 242-246, 1999.
  94. Scott, C. D. and Baxter, R. C. Regulation of soluble insulin-like growth factor-II/mannose 6-phosphate receptor in hepatocytes from intact and regenerating rat liver. *Endocrinology*, 137: 3864-3870, 1996.
  95. MacDonald, R. G., Tepper, M. A., Clairmont, K. B., Perregaux, S. B., and Czech, M. P. Serum form of the rat insulin-like growth factor II/mannose 6-phosphate receptor is truncated in the carboxyl-terminal domain. *J Biol Chem*, 264: 3256-3261, 1989.
  96. Frasca, F., Pandini, G., Scalia, P., Sciacca, L., Mineo, R., Costantino, A., Goldfine, I. D., Belfiore, A., and Vigneri, R. Insulin receptor isoform A, a newly recognized, high-affinity insulin-like growth factor II receptor in fetal and cancer cells. *Mol Cell Biol*, 19: 3278-3288, 1999.
  97. Sorensen, H., Whittaker, L., Hinrichsen, J., Groth, A., and Whittaker, J. Mapping of the insulin-like growth factor II binding site of the Type I insulin-like growth factor receptor by alanine scanning mutagenesis. *FEBS Lett*, 565: 19-22, 2004.
  98. Luo, R. Z., Beniac, D. R., Fernandes, A., Yip, C. C., and Ottensmeyer, F. P. Quaternary structure of the insulin-insulin receptor complex. *Science*, 285: 1077-1080, 1999.
  99. Favelyukis, S., Till, J. H., Hubbard, S. R., and Miller, W. T. Structure and autoregulation of the insulin-like growth factor 1 receptor kinase. *Nat Struct Biol*, 8: 1058-1063, 2001.
  100. Peyssonnaud, C., Provot, S., Felder-Schmittbuhl, M. P., Calothy, G., and Eyche, A. Induction of postmitotic neuroretina cell proliferation by distinct Ras downstream signaling pathways. *Mol Cell Biol*, 20: 7068-7079, 2000.
  101. Yan, J., Roy, S., Apolloni, A., Lane, A., and Hancock, J. F. Ras isoforms vary in their ability to activate Raf-1 and phosphoinositide 3-kinase. *J Biol Chem*, 273: 24052-24056, 1998.
  102. King, A. J., Wireman, R. S., Hamilton, M., and Marshall, M. S. Phosphorylation site specificity of the Pak-mediated regulation of Raf-1 and cooperativity with Src. *FEBS Lett*, 497: 6-14, 2001.
  103. Xu, S., Robbins, D., Frost, J., Dang, A., Lange-Carter, C., and Cobb, M. H. MEKK1 phosphorylates MEK1 and MEK2 but does not cause activation of mitogen-activated protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92: 6808-6812, 1995.
  104. Chang, F., Steelman, L. S., Lee, J. T., Shelton, J. G., Navolanic, P. M., Blalock, W. L., Franklin, R. A., and McCubrey, J. A. Signal transduction mediated by the Ras/Raf/MEK/ERK pathway from cytokine receptors to transcription factors: potential targeting for therapeutic intervention. *Leukemia*, 17: 1263-1293, 2003.
-

105. Foulstone, E., Prince, S., Zaccheo, O., Burns, J. L., Harper, J., Jacobs, C., Church, D., and Hassan, A. B. Insulin-like growth factor ligands, receptors, and binding proteins in cancer. *J Pathol*, 205: 145-153, 2005.
106. Alessi, D. R. Discovery of PDK1, one of the missing links in insulin signal transduction. Colworth Medal Lecture. *Biochem Soc Trans*, 29: 1-14, 2001.
107. Lawlor, M. A. and Alessi, D. R. PKB/Akt: a key mediator of cell proliferation, survival and insulin responses? *J Cell Sci*, 114: 2903-2910, 2001.
108. Gesbert, F., Sellers, W. R., Signoretti, S., Loda, M., and Griffin, J. D. BCR/ABL regulates expression of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 through the phosphatidylinositol 3-Kinase/AKT pathway. *J Biol Chem*, 275: 39223-39230, 2000.
109. Graff, J. R., Konicek, B. W., McNulty, A. M., Wang, Z., Houck, K., Allen, S., Paul, J. D., Hbailu, A., Goode, R. G., Sandusky, G. E., Vessella, R. L., and Neubauer, B. L. Increased AKT activity contributes to prostate cancer progression by dramatically accelerating prostate tumor growth and diminishing p27Kip1 expression. *J Biol Chem*, 275: 24500-24505, 2000.
110. Cross, D. A., Alessi, D. R., Cohen, P., Andjelkovich, M., and Hemmings, B. A. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature*, 378: 785-789, 1995.
111. Diehl, J. A., Cheng, M., Roussel, M. F., and Sherr, C. J. Glycogen synthase kinase-3 $\beta$  regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization. *Genes Dev*, 12: 3499-3511, 1998.
112. Downward, J. How BAD phosphorylation is good for survival. *Nat Cell Biol*, 1: E33-35, 1999.
113. Cardone, M. H., Roy, N., Stennicke, H. R., Salvesen, G. S., Franke, T. F., Stanbridge, E., Frisch, S., and Reed, J. C. Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science*, 282: 1318-1321, 1998.
114. Brunet, A., Bonni, A., Zigmond, M. J., Lin, M. Z., Juo, P., Hu, L. S., Anderson, M. J., Arden, K. C., Blenis, J., and Greenberg, M. E. Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell*, 96: 857-868, 1999.
115. Kops, G. J., de Ruiter, N. D., De Vries-Smits, A. M., Powell, D. R., Bos, J. L., and Burgering, B. M. Direct control of the Forkhead transcription factor AFX by protein kinase B. *Nature*, 398: 630-634, 1999.
116. Dijkers, P. F., Medema, R. H., Lammers, J. W., Koenderman, L., and Coffey, P. J. Expression of the pro-apoptotic Bcl-2 family member Bim is regulated by the forkhead transcription factor FKHR-L1. *Curr Biol*, 10: 1201-1204, 2000.
117. Medema, R. H., Kops, G. J., Bos, J. L., and Burgering, B. M. AFX-like Forkhead transcription factors mediate cell-cycle regulation by Ras and PKB through p27kip1. *Nature*, 404: 782-787, 2000.
118. Accili, D. and Arden, K. C. FoxOs at the crossroads of cellular metabolism, differentiation, and transformation. *Cell*, 117: 421-426, 2004.
119. Renehan, A. G., Zwahlen, M., Minder, C., O'Dwyer, S. T., Shalet, S. M., and Egger, M. Insulin-like growth factor (IGF)-I, IGF binding protein-3, and cancer risk: systematic review and meta-regression analysis. *Lancet*, 363: 1346-1353, 2004.
120. Hassan, A. B. and Macaulay, V. M. The insulin-like growth factor system as a therapeutic target in colorectal cancer. *Ann Oncol*, 13: 349-356, 2002.
121. Martin, D. C., Fowlkes, J. L., Babic, B., and Khokha, R. Insulin-like growth factor II signaling in neoplastic proliferation is blocked by transgenic expression of the metalloproteinase inhibitor TIMP-1. *J Cell Biol*, 146: 881-892, 1999.



122. Lin, S. B., Hsieh, S. H., Hsu, H. L., Lai, M. Y., Kan, L. S., and Au, L. C. Antisense oligodeoxynucleotides of IGF-II selectively inhibit growth of human hepatoma cells overproducing IGF-II. *J Biochem (Tokyo)*, *122*: 717-722, 1997.
123. Gong, Y., Cui, L., and Minuk, G. Y. The expression of insulin-like growth factor binding proteins in human hepatocellular carcinoma. *Mol Cell Biochem*, *207*: 101-104, 2000.
124. Hanafusa, T., Yumoto, Y., Nouse, K., Nakatsukasa, H., Onishi, T., Fujikawa, T., Taniyama, M., Nakamura, S., Uemura, M., Takuma, Y., Yumoto, E., Higashi, T., and Tsuji, T. Reduced expression of insulin-like growth factor binding protein-3 and its promoter hypermethylation in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett*, *176*: 149-158, 2002.
125. Sue, S. R., Chari, R. S., Kong, F. M., Mills, J. J., Fine, R. L., Jirtle, R. L., and Meyers, W. C. Transforming growth factor-beta receptors and mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor-II receptor expression in human hepatocellular carcinoma. *Ann Surg*, *222*: 171-178, 1995.
126. Piao, Z., Choi, Y., Park, C., Lee, W. J., Park, J. H., and Kim, H. Deletion of the M6P/IGF2r gene in primary hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett*, *120*: 39-43, 1997.
127. Enomoto, A., Esumi, M., Yamashita, K., Takagi, K., Takano, S., and Iwai, S. Abnormal nucleotide repeat sequence in the TGF-betaRII gene in hepatocellular carcinoma and in uninvolved liver tissue. *J Pathol*, *195*: 349-354, 2001.
128. Saeki, A., Tamura, S., Ito, N., Kiso, S., Matsuda, Y., Yabuuchi, I., Kawata, S., and Matsuzawa, Y. Lack of frameshift mutations at coding mononucleotide repeats in hepatocellular carcinoma in Japanese patients. *Cancer*, *88*: 1025-1029, 2000.
129. Wada, I., Kanada, H., Nomura, K., Kato, Y., Machinami, R., and Kitagawa, T. Failure to detect genetic alteration of the mannose-6-phosphate/insulin-like growth factor 2 receptor (M6P/IGF2R) gene in hepatocellular carcinomas in Japan. *Hepatology*, *29*: 1718-1721, 1999.
130. Aihara, T., Noguchi, S., Sasaki, Y., Nakano, H., Monden, M., and Imaoka, S. Clonal analysis of precancerous lesion of hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*, *111*: 455-461, 1996.
131. Breuhahn, K., Vreden, S., Haddad, R., Beckebaum, S., Stippel, D., Flemming, P., Nussbaum, T., Caselmann, W. H., Haab, B. B., and Schirmacher, P. Molecular Profiling of Human Hepatocellular Carcinoma Defines Mutually Exclusive Interferon Regulation and Insulin-Like Growth Factor II Overexpression. *Cancer Res*, *64*: 6058-6064., 2004.
132. Ciarani, E., Lasserre, C., Seurin, D., Hamelin, B., Kemeny, F., Franco, D., Czech, M. P., Ullrich, A., and Brechot, C. Differential expression of insulin-like growth factor II mRNA in human primary liver cancers, benign liver tumors, and liver cirrhosis. *Cancer Res*, *48*: 6844-6849., 1988.
133. Sohda, T., Yun, K., Iwata, K., Soejima, H., and Okumura, M. Increased expression of insulin-like growth factor 2 in hepatocellular carcinoma is primarily regulated at the transcriptional level. *Lab Invest*, *75*: 307-311, 1996.
134. Uchida, K., Kondo, M., Takeda, S., Osada, H., Takahashi, T., and Nakao, A. Altered transcriptional regulation of the insulin-like growth factor 2 gene in human hepatocellular carcinoma. *Mol Carcinog*, *18*: 193-198, 1997.
135. Takeda, S., Kondo, M., Kumada, T., Koshikawa, T., Ueda, R., Nishio, M., Osada, H., Suzuki, H., Nagatake, M., Washimi, O., Takagi, K., Takahashi, T., and Nakao, A. Allelic-expression imbalance of the insulin-like growth factor 2 gene in hepatocellular carcinoma and underlying disease. *Oncogene*, *12*: 1589-1592, 1996.

136. Aihara, T., Noguchi, S., Miyoshi, Y., Nakano, H., Sasaki, Y., Nakamura, Y., Monden, M., and Imaoka, S. Allelic imbalance of insulin-like growth factor II gene expression in cancerous and precancerous lesions of the liver. *Hepatology*, 28: 86-89, 1998.
137. Playford, M. P., Bicknell, D., Bodmer, W. F., and Macaulay, V. M. Insulin-like growth factor 1 regulates the location, stability, and transcriptional activity of beta-catenin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97: 12103-12108, 2000.
138. Sadowski, T., Dietrich, S., Koschinsky, F., and Sedlacek, R. Matrix metalloproteinase 19 regulates insulin-like growth factor-mediated proliferation, migration, and adhesion in human keratinocytes through proteolysis of insulin-like growth factor binding protein-3. *Mol Biol Cell*, 14: 4569-4580, 2003.
139. Lee, Y. I., Han, Y. J., Lee, S. Y., Park, S. K., Park, Y. J., Moon, H. B., Shin, J. H., and Lee, J. H. Activation of insulin-like growth factor II signaling by mutant type p53: physiological implications for potentiation of IGF-II signaling by p53 mutant 249. *Mol Cell Endocrinol*, 203: 51-63, 2003.
140. Sedlacek, N., Hasilik, A., Neuhaus, P., Schuppan, D., and Herbst, H. Focal overexpression of insulin-like growth factor 2 by hepatocytes and cholangiocytes in viral liver cirrhosis. *Br J Cancer*, 88: 733-739, 2003.
141. Tanaka, S., Takenaka, K., Matsumata, T., Mori, R., and Sugimachi, K. Hepatitis C virus replication is associated with expression of transforming growth factor-alpha and insulin-like growth factor-II in cirrhotic livers. *Dig Dis Sci*, 41: 208-215, 1996.
142. Lee, S., Park, U., and Lee, Y. I. Hepatitis C virus core protein transactivates insulin-like growth factor II gene transcription through acting concurrently on Egr1 and Sp1 sites. *Virology*, 283: 167-177, 2001.
143. Tanaka, S. and Wands, J. R. Insulin receptor substrate 1 overexpression in human hepatocellular carcinoma cells prevents transforming growth factor beta1-induced apoptosis. *Cancer Res*, 56: 3391-3394, 1996.
144. Nishiyama, M. and Wands, J. R. Cloning and increased expression of an insulin receptor substrate-1-like gene in human hepatocellular carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun*, 183: 280-285, 1992.
145. Kang-Park, S., Lee, J. H., Shin, J. H., and Lee, Y. I. Activation of the IGF-II gene by HBV-X protein requires PKC and p44/p42 map kinase signalings. *Biochem Biophys Res Commun*, 283: 303-307., 2001.
146. Stambolic, V., Suzuki, A., de la Pompa, J. L., Brothers, G. M., Mirtsos, C., Sasaki, T., Ruland, J., Penninger, J. M., Siderovski, D. P., and Mak, T. W. Negative regulation of PKB/Akt-dependent cell survival by the tumor suppressor PTEN. *Cell*, 95: 29-39, 1998.
147. Yao, Y. J., Ping, X. L., Zhang, H., Chen, F. F., Lee, P. K., Ahsan, H., Chen, C. J., Lee, P. H., Peacocke, M., Santella, R. M., and Tsou, H. C. PTEN/MMAC1 mutations in hepatocellular carcinomas. *Oncogene*, 18: 3181-3185, 1999.
148. Waterhouse, P. M., Wang, M. B., and Lough, T. Gene silencing as an adaptive defence against viruses. *Nature*, 411: 834-842, 2001.
149. Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E., and Mello, C. C. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391: 806-811, 1998.
150. Hamilton, A. J. and Baulcombe, D. C. A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science*, 286: 950-952, 1999.
151. Bernstein, E., Caudy, A. A., Hammond, S. M., and Hannon, G. J. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*, 409: 363-366, 2001.
152. Elbashir, S. M., Lendeckel, W., and Tuschl, T. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev*, 15: 188-200, 2001.
153. Sharp, P. A. RNA interference--2001. *Genes Dev*, 15: 485-490., 2001.

154. Hammond, S. M., Caudy, A. A., and Hannon, G. J. Post-transcriptional gene silencing by double-stranded RNA. *Nat Rev Genet*, 2: 110-119, 2001.
155. Dykxhoorn, D. M., Novina, C. D., and Sharp, P. A. Killing the messenger: short RNAs that silence gene expression. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 4: 457-467, 2003.
156. Elbashir, S. M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K., and Tuschl, T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*, 411: 494-498., 2001.
157. Bridge, A. J., Pebernard, S., Ducraux, A., Nicoulaz, A. L., and Iggo, R. Induction of an interferon response by RNAi vectors in mammalian cells. *Nat Genet*, 34: 263-264, 2003.
158. Kim, D. H., Longo, M., Han, Y., Lundberg, P., Cantin, E., and Rossi, J. J. Interferon induction by siRNAs and ssRNAs synthesized by phage polymerase. *Nat Biotechnol*, 22: 321-325, 2004.
159. Sledz, C. A., Holko, M., de Veer, M. J., Silverman, R. H., and Williams, B. R. Activation of the interferon system by short-interfering RNAs. *Nat Cell Biol*, 5: 834-839, 2003.
160. Lee, R. C. and Ambros, V. An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science*, 294: 862-864, 2001.
161. Lau, N. C., Lim, L. P., Weinstein, E. G., and Bartel, D. P. An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science*, 294: 858-862, 2001.
162. Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Lendeckel, W., and Tuschl, T. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science*, 294: 853-858, 2001.
163. Zeng, Y., Wagner, E. J., and Cullen, B. R. Both natural and designed micro RNAs can inhibit the expression of cognate mRNAs when expressed in human cells. *Mol Cell*, 9: 1327-1333, 2002.
164. Elbashir, S. M., Harborth, J., Weber, K., and Tuschl, T. Analysis of gene function in somatic mammalian cells using small interfering RNAs. *Methods*, 26: 199-213, 2002.
165. Kishida, T., Asada, H., Gojo, S., Ohashi, S., Shin-Ya, M., Yasutomi, K., Terauchi, R., Takahashi, K. A., Kubo, T., Imanishi, J., and Mazda, O. Sequence-specific gene silencing in murine muscle induced by electroporation-mediated transfer of short interfering RNA. *J Gene Med*, 6: 105-110, 2004.
166. McManus, M. T., Haines, B. B., Dillon, C. P., Whitehurst, C. E., van Parijs, L., Chen, J., and Sharp, P. A. Small interfering RNA-mediated gene silencing in T lymphocytes. *J Immunol*, 169: 5754-5760, 2002.
167. Arts, G. J., Langemeijer, E., Tissingh, R., Ma, L., Pavliska, H., Dokic, K., Dooijes, R., Mesic, E., Clasen, R., Michiels, F., van der Schueren, J., Lambrecht, M., Herman, S., Brys, R., Thys, K., Hoffmann, M., Tomme, P., and van Es, H. Adenoviral vectors expressing siRNAs for discovery and validation of gene function. *Genome Res*, 13: 2325-2332, 2003.
168. Shen, C., Buck, A. K., Liu, X., Winkler, M., and Reske, S. N. Gene silencing by adenovirus-delivered siRNA. *FEBS Lett*, 539: 111-114, 2003.
169. McCaffrey, A. P., Meuse, L., Pham, T. T., Conklin, D. S., Hannon, G. J., and Kay, M. A. RNA interference in adult mice. *Nature*, 418: 38-39., 2002.
170. Lewis, D. L., Hagstrom, J. E., Loomis, A. G., Wolff, J. A., and Herweijer, H. Efficient delivery of siRNA for inhibition of gene expression in postnatal mice. *Nat Genet*, 32: 107-108, 2002.
171. Nykanen, A., Haley, B., and Zamore, P. D. ATP requirements and small interfering RNA structure in the RNA interference pathway. *Cell*, 107: 309-321, 2001.

172. Martinez, J., Patkaniowska, A., Urlaub, H., Luhrmann, R., and Tuschl, T. Single-stranded antisense siRNAs guide target RNA cleavage in RNAi. *Cell*, 110: 563-574, 2002.
173. Hutvagner, G. and Zamore, P. D. A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. *Science*, 297: 2056-2060, 2002.
174. Reynolds, A., Leake, D., Boese, Q., Scaringe, S., Marshall, W. S., and Khvorova, A. Rational siRNA design for RNA interference. *Nat Biotechnol*, 22: 326-330, 2004.
175. Ewens, W. J. and Grant, G. R. *Statistical Methods in Bioinformatics*. New York: Grant Springer-Verlag, 2001.
176. Dai, M., Wang, P., Boyd, A. D., Kostov, G., Athey, B., Jones, E. G., Bunney, W. E., Myers, R. M., Speed, T. P., Akil, H., Watson, S. J., and Meng, F. Evolving gene/transcript definitions significantly alter the interpretation of GeneChip data. *Nucleic Acids Res*, 33: e175, 2005.
177. Husson, H., Carideo, E. G., Neuberg, D., Schultze, J., Munoz, O., Marks, P. W., Donovan, J. W., Chillemi, A. C., O'Connell, P., and Freedman, A. S. Gene expression profiling of follicular lymphoma and normal germinal center B cells using cDNA arrays. *Blood*, 99: 282-289, 2002.
178. Bohula, E. A., Salisbury, A. J., Sohail, M., Playford, M. P., Riedemann, J., Southern, E. M., and Macaulay, V. M. The efficacy of small interfering RNAs targeted to the type 1 insulin-like growth factor receptor (IGF1R) is influenced by secondary structure in the IGF1R transcript. *J Biol Chem*, 278: 15991-15997, 2003.
179. Scacheri, P. C., Rozenblatt-Rosen, O., Caplen, N. J., Wolfsberg, T. G., Umayam, L., Lee, J. C., Hughes, C. M., Shanmugam, K. S., Bhattacharjee, A., Meyerson, M., and Collins, F. S. Short interfering RNAs can induce unexpected and divergent changes in the levels of untargeted proteins in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101: 1892-1897, 2004.
180. Gil, J. and Esteban, M. Induction of apoptosis by the dsRNA-dependent protein kinase (PKR): mechanism of action. *Apoptosis*, 5: 107-114, 2000.
181. Elbashir, S. M., Martinez, J., Patkaniowska, A., Lendeckel, W., and Tuschl, T. Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate  
RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Embo J*, 20: 6877-6888, 2001.
182. Tuschl, T., Zamore, P. D., Lehmann, R., Bartel, D. P., and Sharp, P. A. Targeted mRNA degradation by double-stranded RNA in vitro. *Genes Dev*, 13: 3191-3197, 1999.
183. Holen, T., Amarzguioui, M., Wiiger, M. T., Babaie, E., and Prydz, H. Positional effects of short interfering RNAs targeting the human coagulation trigger Tissue Factor. *Nucleic Acids Res*, 30: 1757-1766, 2002.
184. Birmingham, A., Anderson, E. M., Reynolds, A., Ilsley-Tyree, D., Leake, D., Fedorov, Y., Baskerville, S., Maksimova, E., Robinson, K., Karpilow, J., Marshall, W. S., and Khvorova, A. 3' UTR seed matches, but not overall identity, are associated with RNAi off-targets. *Nat Methods*, 3: 199-204, 2006.
185. Lund, P., Schubert, D., Niketeghad, F., and Schirmacher, P. Autocrine inhibition of chemotherapy response in human liver tumor cells by insulin-like growth factor-II. *Cancer Lett*, 206: 85-96, 2004.
186. Guo, N., Ye, J. J., Liang, S. J., Mineo, R., Li, S. L., Giannini, S., Plymate, S. R., Sikes, R. A., and Fujita-Yamaguchi, Y. The role of insulin-like growth factor-II in cancer growth and progression evidenced by the use of ribozymes and prostate cancer progression models. *Growth Horm IGF Res*, 13: 44-53, 2003.

187. Yao, X., Hu, J. F., Daniels, M., Shiran, H., Zhou, X., Yan, H., Lu, H., Zeng, Z., Wang, Q., Li, T., and Hoffman, A. R. A methylated oligonucleotide inhibits IGF2 expression and enhances survival in a model of hepatocellular carcinoma. *J Clin Invest*, *111*: 265-273., 2003.
188. Nielsen, F. C. The molecular and cellular biology of insulin-like growth factor II. *Prog Growth Factor Res*, *4*: 257-290, 1992.
189. Nielsen, F. C., Ostergaard, L., Nielsen, J., and Christiansen, J. Growth-dependent translation of IGF-II mRNA by a rapamycin-sensitive pathway. *Nature*, *377*: 358-362, 1995.
190. Rochester, M. A., Riedemann, J., Hellowell, G. O., Brewster, S. F., and Macaulay, V. M. Silencing of the IGF1R gene enhances sensitivity to DNA-damaging agents in both PTEN wild-type and mutant human prostate cancer. *Cancer Gene Ther*, *12*: 90-100, 2005.
191. Resnicoff, M., Abraham, D., Yutanawiboonchai, W., Rotman, H. L., Kajstura, J., Rubin, R., Zoltick, P., and Baserga, R. The insulin-like growth factor I receptor protects tumor cells from apoptosis in vivo. *Cancer Res*, *55*: 2463-2469, 1995.
192. Scotlandi, K., Benini, S., Nanni, P., Lollini, P. L., Nicoletti, G., Landuzzi, L., Serra, M., Manara, M. C., Picci, P., and Baldini, N. Blockage of insulin-like growth factor-I receptor inhibits the growth of Ewing's sarcoma in athymic mice. *Cancer Res*, *58*: 4127-4131, 1998.
193. Nolten, L. A., van Schaik, F. M., Steenbergh, P. H., and Sussenbach, J. S. Expression of the insulin-like growth factor I gene is stimulated by the liver-enriched transcription factors C/EBP alpha and LAP. *Mol Endocrinol*, *8*: 1636-1645, 1994.
194. Louvi, A., Accili, D., and Efstratiadis, A. Growth-promoting interaction of IGF-II with the insulin receptor during mouse embryonic development. *Dev Biol*, *189*: 33-48, 1997.
195. Guvakova, M. A. and Surmacz, E. The activated insulin-like growth factor I receptor induces depolarization in breast epithelial cells characterized by actin filament disassembly and tyrosine dephosphorylation of FAK, Cas, and paxillin. *Exp Cell Res*, *251*: 244-255, 1999.
196. Lamothe, B., Baudry, A., Christoffersen, C. T., De Meyts, P., Jami, J., Bucchini, D., and Joshi, R. L. Insulin receptor-deficient cells as a new tool for dissecting complex interplay in insulin and insulin-like growth factors. *FEBS Lett*, *426*: 381-385, 1998.
197. Scalia, P., Heart, E., Comai, L., Vigneri, R., and Sung, C. K. Regulation of the Akt/Glycogen synthase kinase-3 axis by insulin-like growth factor-II via activation of the human insulin receptor isoform-A. *J Cell Biochem*, *82*: 610-618, 2001.
198. Liu, J. P., Baker, J., Perkins, A. S., Robertson, E. J., and Efstratiadis, A. Mice carrying null mutations of the genes encoding insulin-like growth factor I (Igf-1) and type 1 IGF receptor (Igf1r). *Cell*, *75*: 59-72, 1993.
199. Cadoret, A., Desbois-Mouthon, C., Wendum, D., Leneuve, P., Perret, C., Tronche, F., Housset, C., and Holzenberger, M. c-myc-induced hepatocarcinogenesis in the absence of IGF-I receptor. *Int J Cancer*, *114*: 668-672, 2005.
200. Konstantopoulos, N. and Clark, S. Insulin and insulin-like growth factor-1 stimulate dephosphorylation of paxillin in parallel with focal adhesion kinase. *Biochem J*, *314* ( Pt 2): 387-390, 1996.
201. Avizienyte, E., Wyke, A. W., Jones, R. J., McLean, G. W., Westhoff, M. A., Brunton, V. G., and Frame, M. C. Src-induced de-regulation of E-cadherin in colon cancer cells requires integrin signalling. *Nat Cell Biol*, *4*: 632-638, 2002.
202. Irby, R. B., Mao, W., Coppola, D., Kang, J., Loubeau, J. M., Trudeau, W., Karl, R., Fujita, D. J., Jove, R., and Yeatman, T. J. Activating SRC mutation in a subset of advanced human colon cancers. *Nat Genet*, *21*: 187-190, 1999.

203. Simcha, I., Shtutman, M., Salomon, D., Zhurinsky, J., Sadot, E., Geiger, B., and Ben-Ze'ev, A. Differential nuclear translocation and transactivation potential of beta-catenin and plakoglobin. *J Cell Biol*, 141: 1433-1448, 1998.
204. Desbois-Mouthon, C., Cadoret, A., Blivet-Van Eggelpoel, M. J., Bertrand, F., Cherqui, G., Perret, C., and Capeau, J. Insulin and IGF-1 stimulate the beta-catenin pathway through two signalling cascades involving GSK-3beta inhibition and Ras activation. *Oncogene*, 20: 252-259, 2001.
205. Christofori, G. and Semb, H. The role of the cell-adhesion molecule E-cadherin as a tumour-suppressor gene. *Trends Biochem Sci*, 24: 73-76., 1999.
206. Pollak, M. Insulin-like growth factors and prostate cancer. *Epidemiol Rev*, 23: 59-66, 2001.
207. Pollak, M. Insulin-like growth factor physiology and cancer risk. *Eur J Cancer*, 36: 1224-1228, 2000.
208. Hammani, K., Blakis, A., Morsette, D., Bowcock, A. M., Schmutte, C., Henriet, P., and DeClerck, Y. A. Structure and characterization of the human tissue inhibitor of metalloproteinases-2 gene. *J Biol Chem*, 271: 25498-25505, 1996.
209. Grotewold, L. and Ruther, U. The Wnt antagonist Dickkopf-1 is regulated by Bmp signaling and c-Jun and modulates programmed cell death. *Embo J*, 21: 966-975, 2002.
210. Fedi, P., Bafico, A., Nieto Soria, A., Burgess, W. H., Miki, T., Bottaro, D. P., Kraus, M. H., and Aaronson, S. A. Isolation and biochemical characterization of the human Dkk-1 homologue, a novel inhibitor of mammalian Wnt signaling. *J Biol Chem*, 274: 19465-19472, 1999.
211. Mao, B., Wu, W., Li, Y., Hoppe, D., Stanek, P., Glinka, A., and Niehrs, C. LDL-receptor-related protein 6 is a receptor for Dickkopf proteins. *Nature*, 411: 321-325, 2001.
212. Girard, F., Strausfeld, U., Fernandez, A., and Lamb, N. J. Cyclin A is required for the onset of DNA replication in mammalian fibroblasts. *Cell*, 67: 1169-1179, 1991.
213. Bennin, D. A., Don, A. S., Brake, T., McKenzie, J. L., Rosenbaum, H., Ortiz, L., DePaoli-Roach, A. A., and Horne, M. C. Cyclin G2 associates with protein phosphatase 2A catalytic and regulatory B' subunits in active complexes and induces nuclear aberrations and a G1/S phase cell cycle arrest. *J Biol Chem*, 277: 27449-27467, 2002.
214. Yusuf, I., Zhu, X., Kharas, M. G., Chen, J., and Fruman, D. A. Optimal B-cell proliferation requires phosphoinositide 3-kinase-dependent inactivation of FOXO transcription factors. *Blood*, 104: 784-787, 2004.
215. Martinez-Gac, L., Marques, M., Garcia, Z., Campanero, M. R., and Carrera, A. C. Control of cyclin G2 mRNA expression by forkhead transcription factors: novel mechanism for cell cycle control by phosphoinositide 3-kinase and forkhead. *Mol Cell Biol*, 24: 2181-2189, 2004.
216. Liotta, L. A., Steeg, P. S., and Stetler-Stevenson, W. G. Cancer metastasis and angiogenesis: an imbalance of positive and negative regulation. *Cell*, 64: 327-336, 1991.
217. Stetler-Stevenson, W. G., Aznavoorian, S., and Liotta, L. A. Tumor cell interactions with the extracellular matrix during invasion and metastasis. *Annu Rev Cell Biol*, 9: 541-573, 1993.
218. Scharf, J. G., Dombrowski, F., and Ramadori, G. The IGF axis and hepatocarcinogenesis. *Mol Pathol*, 54: 138-144., 2001.
219. Scott, C. D., Ballesteros, M., Madrid, J., and Baxter, R. C. Soluble insulin-like growth factor-II/mannose 6-P receptor inhibits deoxyribonucleic acid synthesis in cultured rat hepatocytes. *Endocrinology*, 137: 873-878, 1996.

- 
220. Zhang, C., Chakravarty, D., Sakabe, I., Mewani, R. R., Boudreau, H. E., Kumar, D., Ahmad, I., and Kasid, U. N. Role of SCC-S2 in experimental metastasis and modulation of VEGFR-2, MMP-1, and MMP-9 expression. *Mol Ther*, *13*: 947-955, 2006.
221. Sabapathy, K. and Wagner, E. F. JNK2: a negative regulator of cellular proliferation. *Cell Cycle*, *3*: 1520-1523, 2004.
222. Brown, K., Buchmann, A., and Balmain, A. Carcinogen-induced mutations in the mouse c-Ha-ras gene provide evidence of multiple pathways for tumor progression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *87*: 538-542, 1990.
223. Pouliot, F. and Labrie, C. Role of Smad1 and Smad4 proteins in the induction of p21WAF1,Cip1 during bone morphogenetic protein-induced growth arrest in human breast cancer cells. *J Endocrinol*, *172*: 187-198, 2002.
224. Vidal, A. and Koff, A. Cell-cycle inhibitors: three families united by a common cause. *Gene*, *247*: 1-15, 2000.
225. Graham, A., Francis-West, P., Brickell, P., and Lumsden, A. The signalling molecule BMP4 mediates apoptosis in the rhombencephalic neural crest. *Nature*, *372*: 684-686, 1994.
226. Scharf, J. G., Schmidt-Sandte, W., Pahernik, S. A., Ramadori, G., Braulke, T., and Hartmann, H. Characterization of the insulin-like growth factor axis in a human hepatoma cell line (PLC). *Carcinogenesis*, *19*: 2121-2128, 1998.
227. Gray, S. G., Eriksson, T., Ekstrom, C., Holm, S., von Schweinitz, D., Kogner, P., Sandstedt, B., Pietsch, T., and Ekstrom, T. J. Altered expression of members of the IGF-axis in hepatoblastomas. *Br J Cancer*, *82*: 1561-1567, 2000.
228. Jones, J. I., Gockerman, A., Busby, W. H., Jr., Wright, G., and Clemmons, D. R. Insulin-like growth factor binding protein 1 stimulates cell migration and binds to the alpha 5 beta 1 integrin by means of its Arg-Gly-Asp sequence. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *90*: 10553-10557, 1993.
229. Rauschnabel, U., Koscielniak, E., Ranke, M. B., Schuett, B., and Elmlinger, M. W. RGD-specific binding of IGFBP-2 to alpha5 beta1-integrin of Ewing sarcoma cells. *Growth Horm IGF Res*, *9*: 369-370, 1999.
230. Schuett, B., Langkamp, M., Ranke, M. B., and Elmlinger, M. W. Intracellular signalling of insulin-like growth factor binding protein-2. *Growth Horm IGF Res*, *10*: 29, 2000.
231. Chiou, W. F., Tsai, H. R., Yang, L. M., and Tsai, W. J. C5a differentially stimulates the ERK1/2 and p38 MAPK phosphorylation through independent signaling pathways to induced chemotactic migration in RAW264.7 macrophages. *Int Immunopharmacol*, *4*: 1329-1341, 2004.
232. Perianayagam, M. C., Balakrishnan, V. S., Pereira, B. J., and Jaber, B. L. C5a delays apoptosis of human neutrophils via an extracellular signal-regulated kinase and Bad-mediated signalling pathway. *Eur J Clin Invest*, *34*: 50-56, 2004.
233. Perianayagam, M. C., Balakrishnan, V. S., King, A. J., Pereira, B. J., and Jaber, B. L. C5a delays apoptosis of human neutrophils by a phosphatidylinositol 3-kinase-signaling pathway. *Kidney Int*, *61*: 456-463, 2002.
234. Mastellos, D., Papadimitriou, J. C., Franchini, S., Tsonis, P. A., and Lambris, J. D. A novel role of complement: mice deficient in the fifth component of complement (C5) exhibit impaired liver regeneration. *J Immunol*, *166*: 2479-2486, 2001.
235. Gerard, N. P. and Gerard, C. The chemotactic receptor for human C5a anaphylatoxin. *Nature*, *349*: 614-617, 1991.
236. Hillebrandt, S., Goos, C., Matern, S., and Lammert, F. Genome-wide analysis of hepatic fibrosis in inbred mice identifies the susceptibility locus Hfib1 on chromosome 15. *Gastroenterology*, *123*: 2041-2051, 2002.
-

- 
237. Hillebrandt, S., Wasmuth, H. E., Weiskirchen, R., Hellerbrand, C., Keppeler, H., Werth, A., Schirin-Sokhan, R., Wilkens, G., Geier, A., Lorenzen, J., Kohl, J., Gressner, A. M., Matern, S., and Lammert, F. Complement factor 5 is a quantitative trait gene that modifies liver fibrogenesis in mice and humans. *Nat Genet*, 37: 835-843, 2005.
238. Feng, Y., Zhu, Z., Xiao, X., Choudhry, V., Barrett, J. C., and Dimitrov, D. S. Novel human monoclonal antibodies to insulin-like growth factor (IGF)-II that potently inhibit the IGF receptor type I signal transduction function. *Mol Cancer Ther*, 5: 114-120, 2006.
239. Adachi, Y., Lee, C. T., Coffee, K., Yamagata, N., Ohm, J. E., Park, K. H., Dikov, M. M., Nadaf, S. R., Arteaga, C. L., and Carbone, D. P. Effects of genetic blockade of the insulin-like growth factor receptor in human colon cancer cell lines. *Gastroenterology*, 123: 1191-1204, 2002.
240. Min, Y., Adachi, Y., Yamamoto, H., Imsumran, A., Arimura, Y., Endo, T., Hinoda, Y., Lee, C. T., Nadaf, S., Carbone, D. P., and Imai, K. Insulin-like growth factor I receptor blockade enhances chemotherapy and radiation responses and inhibits tumour growth in human gastric cancer xenografts. *Gut*, 54: 591-600, 2005.
241. Min, Y., Adachi, Y., Yamamoto, H., Ito, H., Itoh, F., Lee, C. T., Nadaf, S., Carbone, D. P., and Imai, K. Genetic blockade of the insulin-like growth factor-I receptor: a promising strategy for human pancreatic cancer. *Cancer Res*, 63: 6432-6441, 2003.
242. Blum, G., Gazit, A., and Levitzki, A. Substrate competitive inhibitors of IGF-1 receptor kinase. *Biochemistry*, 39: 15705-15712, 2000.
243. Girnita, A., Girnita, L., del Prete, F., Bartolazzi, A., Larsson, O., and Axelson, M. Cyclolignans as inhibitors of the insulin-like growth factor-1 receptor and malignant cell growth. *Cancer Res*, 64: 236-242., 2004.
244. Garcia-Echeverria, C., Pearson, M. A., Marti, A., Meyer, T., Mestan, J., Zimmermann, J., Gao, J., Brueggen, J., Capraro, H. G., Cozens, R., Evans, D. B., Fabbro, D., Furet, P., Porta, D. G., Liebetanz, J., Martiny-Baron, G., Ruetz, S., and Hofmann, F. In vivo antitumor activity of NVP-AEW541-A novel, potent, and selective inhibitor of the IGF-IR kinase. *Cancer Cell*, 5: 231-239., 2004.
245. Resnicoff, M., Sell, C., Rubini, M., Coppola, D., Ambrose, D., Baserga, R., and Rubin, R. Rat glioblastoma cells expressing an antisense RNA to the insulin-like growth factor-1 (IGF-1) receptor are nontumorigenic and induce regression of wild-type tumors. *Cancer Res*, 54: 2218-2222, 1994.
246. Trojan, J., Johnson, T. R., Rudin, S. D., Ilan, J., and Tykocinski, M. L. Treatment and prevention of rat glioblastoma by immunogenic C6 cells expressing antisense insulin-like growth factor I RNA. *Science*, 259: 94-97, 1993.
247. Mitsiades, C. S., Mitsiades, N. S., McMullan, C. J., Poulaki, V., Shringarpure, R., Akiyama, M., Hideshima, T., Chauhan, D., Joseph, M., Libermann, T. A., Garcia-Echeverria, C., Pearson, M. A., Hofmann, F., Anderson, K. C., and Kung, A. L. Inhibition of the insulin-like growth factor receptor-1 tyrosine kinase activity as a therapeutic strategy for multiple myeloma, other hematologic malignancies, and solid tumors. *Cancer Cell*, 5: 221-230, 2004.
248. Scotlandi, K., Manara, M. C., Nicoletti, G., Lollini, P. L., Lukas, S., Benini, S., Croci, S., Perdichizzi, S., Zambelli, D., Serra, M., Garcia-Echeverria, C., Hofmann, F., and Picci, P. Antitumor activity of the insulin-like growth factor-I receptor kinase inhibitor NVP-AEW541 in musculoskeletal tumors. *Cancer Res*, 65: 3868-3876, 2005.
249. Yasumaru, M., Tsuji, S., Tsujii, M., Irie, T., Komori, M., Kimura, A., Nishida, T., Kakiuchi, Y., Kawai, N., Murata, H., Horimoto, M., Sasaki, Y., Hayashi, N., Kawano, S., and Hori, M. Inhibition of angiotensin II activity enhanced the antitumor effect of
-



- cyclooxygenase-2 inhibitors via insulin-like growth factor I receptor pathway. *Cancer Res*, 63: 6726-6734, 2003.
250. Persons, D. L., Yazlovitskaya, E. M., Cui, W., and Pelling, J. C. Cisplatin-induced activation of mitogen-activated protein kinases in ovarian carcinoma cells: inhibition of extracellular signal-regulated kinase activity increases sensitivity to cisplatin. *Clin Cancer Res*, 5: 1007-1014, 1999.
251. Gao, X. S., Asaumi, J., Kawasaki, S., Nishikawa, K., Kuroda, M., Takeda, Y., Hiraki, Y., Ihara, M., and Ohnishi, T. Sensitivity of anticancer drugs in NIH3T3' cells transfected with oncogenes accompanied by pSV2neo vector. *Anticancer Res*, 15: 1911-1914, 1995.

## 7. Anhang

### 7.1 Tabellen regulierter Gene nach siRNA Transfektion



**Tabelle A: Gene, durch IGF1R-Reduktion aber nicht durch nonsense siRNA im Vergleich zu unbehandelten Zellen signifikant und biologisch relevant reguliert**

Gen	'gene bank accession no.'	IGF-II ds1	IGF-II ds3	INSR ds1	IGF1R ds3	Rez. Mix	nonsense siRNA	Gen	'gene bank accession no.'	IGF-II ds1	IGF-II ds3	INSR ds1	IGF1R ds3	Rez. Mix	nonsense siRNA
cadherin, EGF LAG seven-pass G-type receptor 3 (flamingo homolog, Drosophila)	NM_001407	1,19	1,27	1,04	1,50	1,37	1,18	synaptobrevin-like 1	NM_005638	0,95	0,82	0,92	0,32	0,45	0,95
5'-nucleotidase, cytosolic II	BC001595	1,18	1,15	0,92	1,50	1,52	0,95	mutS homolog 2, colon cancer, nonpolyposis type 1 (E. coli)	U04045	0,88	1,03	0,91	0,33	0,39	0,87
CCR4-NOT transcription complex, subunit 8	AF180476	1,18	1,31	0,97	1,50	1,30	1,17	LR8 protein	NM_014020	0,52	0,84	0,70	0,33	0,40	1,41
KIAA0350 protein	AA731693	1,16	1,04	1,00	1,50	1,31	1,17	likely ortholog of mouse hypoxia induced gene 1	NM_014056	1,04	0,82	0,83	0,34	0,42	0,94
TRAF2 and NCK interacting kinase	AF172268	1,42	1,27	1,00	1,50	1,25	0,89	alanyl-tRNA synthetase	NM_001605	0,64	0,83	1,00	0,35	0,40	0,72
lysosomal-associated membrane protein 1	NM_005561	0,94	1,04	1,02	1,51	1,30	1,00	fatty acid binding protein 1, liver	NM_001443	0,50	0,64	0,70	0,37	0,43	0,74
cadherin 19, type 2	NM_021153	1,27	1,57	0,99	1,51	1,59	1,17	inositol(myo)-1(or 4)-monophosphatase 2	NM_014214	0,95	1,03	0,83	0,37	0,41	1,11
hypothetical protein MGC8974	AL031427	1,31	1,23	0,97	1,51	1,31	1,11	cytochrome c oxidase subunit VIIa polypeptide 2 like	NM_004718	0,98	0,83	0,90	0,38	0,40	1,15
hypothetical protein FLJ14166	NM_024565	1,38	1,48	0,89	1,51	1,18	1,03	carbonic anhydrase II	M36532	0,45	0,48	0,88	0,38	0,51	0,71
protocadherin beta 8	NM_019120	1,12	1,18	1,01	1,51	1,37	0,94	fatty acid desaturase 1	BE540552	0,53	1,09	0,60	0,38	0,42	0,75
epiplakin 1	NM_031308	1,07	1,13	0,96	1,51	1,17	1,23	male-enhanced antigen	NM_014623	0,96	0,87	0,87	0,38	0,49	0,77
putative translation initiation factor	AF083441	1,01	1,08	1,05	1,51	1,46	1,04	HSPC009 protein	NM_014019	0,76	0,87	0,97	0,38	0,45	0,78
ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 7	NM_020354	1,05	0,95	0,99	1,51	1,26	0,99	solute carrier family 22 (organic cation transporter), member 18	NM_002555	0,90	0,58	1,00	0,40	0,46	0,80
transcription factor 12 (HTF4, helix-loop-helix transcription factors 4)	AL559478	1,14	1,20	0,88	1,51	1,33	1,15	solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; ornithine transporter) member 15	NM_014252	0,71	0,58	0,90	0,40	0,52	0,72
Mouse Mammary Tumor Virus Receptor homolog 1	BF974389	1,17	1,35	0,98	1,51	1,28	1,30	growth hormone inducible transmembrane protein	AL136713	0,78	0,84	0,87	0,41	0,52	0,88
sirtuin (silent mating type information regulation 2 homolog) 1 (S. cerevisiae)	NM_012238	1,12	1,50	0,92	1,51	1,26	1,33	transforming, acidic coiled-coil containing protein 1	NM_006283	0,86	0,84	0,84	0,42	0,53	0,71
transmembrane protein with EGF-like and two follistatin-like domains 1	BF439316	1,30	1,89	1,01	1,51	1,10	1,15	aminoacylase 1	NM_000666	0,70	0,52	0,96	0,42	0,50	0,90
hematopoietically expressed homeobox	NM_001529	1,28	1,27	0,97	1,51	1,55	1,17	NAD(P)H dehydrogenase, quinone 2	NM_000904	0,57	0,53	0,92	0,42	0,48	0,78
TNFAIP3 interacting protein 1	NM_006058	1,13	0,89	0,97	1,51	1,29	1,20	pyruvate dehydrogenase complex, component X	NM_003477	0,86	0,62	0,91	0,42	0,56	0,83
suppressor of hairy wing homolog 1 (Drosophila)	AA558468	1,26	1,16	1,16	1,52	1,27	1,06	pro-oncosis receptor inducing membrane injury gene	BG538627	1,12	0,91	0,85	0,43	0,59	0,99
thyroid hormone receptor interactor 3	AI131008	1,03	1,09	0,89	1,52	1,26	1,10	dicarbonyl/L-xylulose reductase	NM_016286	0,63	0,69	0,90	0,43	0,52	0,86
collagen, type I, alpha 1	K01228	2,34	1,77	1,13	1,52	1,45	1,22	phosphorylase, glycogen; liver (Hers disease, glycogen storage disease type VI)	NM_002863	0,68	0,45	0,83	0,43	0,55	1,15
KIAA0515	AB011087	0,98	1,19	0,93	1,52	1,42	1,14	phosphoglucomutase 1	NM_002633	0,75	0,78	0,96	0,45	0,57	1,18
single-stranded DNA binding protein 2	NM_012446	1,42	1,68	1,00	1,52	1,25	1,01	clathrin, light polypeptide (Lca)	NM_007096	0,97	0,98	0,80	0,45	0,45	0,98
tubby like protein 4	NM_020245	1,21	1,42	0,94	1,52	1,28	1,15	fumarylacetoacetate hydrolase (fumarylacetoacetase)	NM_000137	0,70	0,56	0,94	0,45	0,51	0,72
KIAA0495	AI073551	1,07	1,30	1,02	1,52	1,45	1,43	TAF12 RNA polymerase II, TATA box binding protein (TBP)-associated factor, 20kDa	D50544	0,86	0,82	1,00	0,46	0,51	0,79
P antigen family, member 1 (prostate associated)	NM_003785	1,01	1,02	1,03	1,53	1,19	0,91	biliverdin reductase B (flavin reductase (NADPH))	NM_000713	0,83	0,49	0,91	0,46	0,46	0,68
cell division cycle 2-like 6 (CDK8-like) /// cell division cycle 2-like 6 (CDK8-like)	AY028424	1,12	1,43	0,92	1,53	1,38	1,24	procollagen-lysine, 2-oxoglutarate 5-dioxygenase 2	AI754404	0,85	1,24	0,96	0,46	0,59	1,08
RNA binding motif protein 30	BC003503	1,04	1,06	0,94	1,53	1,26	0,88	v-myb myeloblastosis viral oncogene homolog (avian)-like 2	NM_002466	0,72	1,07	0,85	0,47	0,59	0,88
ribosomal protein L22	D17652	0,77	0,93	0,95	1,53	1,32	1,43	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3 pseudogene 1	NM_005758	0,84	1,07	0,96	0,47	0,60	1,16
eukaryotic translation initiation factor 2C, 3	NM_024852	1,13	1,02	1,03	1,53	1,41	0,97	CGI-119 protein	NM_016056	0,94	0,94	0,80	0,47	0,53	0,90
calpain 2, (m/II) large subunit	M23254	5,17	1,19	1,11	1,53	1,27	1,17	solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; citrate transporter), member 1	U25147	0,55	0,75	0,80	0,48	0,55	0,86
RING1 and YY1 binding protein	AB029551	1,36	1,44	0,92	1,53	1,35	1,13	crystallin, zeta (quinone reductase)	NM_001889	0,95	0,63	0,86	0,48	0,62	0,77
HMG-box transcription factor 1	NM_012257	1,09	1,24	1,01	1,53	1,33	1,20	TNF receptor-associated protein 1	NM_016292	0,66	0,73	1,00	0,49	0,64	0,69

Die Genexpression ist als x-fache Veränderung im Vergleich zu unbehandelten Zellen angegeben



## Fortsetzung Tabelle A: Gene, durch IGF1R-Reduktion aber nicht durch nonsense siRNA im Vergleich zu unbehandelten Zellen signifikant und biologisch relevant reguliert

Gen	'gene bank accession no.'	IGF-II ds1	IGF-II ds3	INSR ds1	IGF1R ds3	Rez. Mix	nonsense siRNA	Gen	'gene bank accession no.'	IGF-II ds1	IGF-II ds3	INSR ds1	IGF1R ds3	Rez. Mix	nonsense siRNA
zinc finger protein 277	AK027128	0,94	1,12	0,88	1,53	1,32	1,16	R3H domain (binds single-stranded nucleic acids) containing	NM_015361	0,98	0,87	0,82	0,49	0,57	0,90
brain-derived neurotrophic factor	NM_001709	1,27	1,97	1,11	1,53	1,41	1,07	CD302 antigen	NM_014880	0,80	0,70	0,80	0,49	0,65	0,67
KIAA0423	AI823592	1,04	1,14	1,08	1,53	1,41	1,32	scavenger receptor class B, member 1	NM_005505	0,55	0,59	0,92	0,49	0,63	0,89
programmed cell death 6 interacting protein	NM_013374	1,24	1,14	0,95	1,53	1,48	1,15	polymerase (DNA directed), epsilon 3 (p17 subunit)	BC004170	0,64	0,77	0,86	0,49	0,64	0,76
nuclear prelamin A recognition factor	NM_012336	1,12	1,26	0,99	1,54	1,46	0,85	mitochondrial ribosomal protein L9	BC004517	0,92	0,98	0,87	0,50	0,53	0,85
UDP-glucuronate decarboxylase 1	NM_025076	1,78	1,11	0,95	1,54	1,26	1,26	complement component 3	NM_000064	0,19	0,31	0,94	0,50	0,66	0,83
makorin, ring finger protein, 1 /// makorin, ring finger protein, 1	NM_013446	1,10	1,00	0,88	1,54	1,40	1,31	putative MAPK activating protein	AI983505	1,16	0,95	0,96	0,50	0,55	1,02
poly (ADP-ribose) polymerase family, member 8	NM_024615	1,12	1,40	1,07	1,54	1,35	1,28	nuclear protein E3-3	BC002873	0,58	0,59	0,97	0,50	0,61	0,72
hypothetical protein MGC4504	NM_024111	1,18	1,09	1,03	1,55	1,24	1,05	glutathione S-transferase A4	NM_001512	0,60	0,86	0,89	0,50	0,58	0,70
myosin head domain containing 1	NM_025109	1,04	1,03	1,14	1,55	1,46	1,18	hypothetical protein FLJ22390	NM_022746	0,44	0,62	0,93	0,50	0,60	0,68
cysteine-rich hydrophobic domain 2	NM_012110	1,10	1,23	0,90	1,55	1,40	0,99	E-1 enzyme	NM_021204	0,76	0,78	0,91	0,51	0,63	0,82
protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 12	NM_002835	1,36	1,17	1,01	1,55	1,32	1,22	chromosome 20 open reading frame 59	NM_022082	0,91	0,55	0,95	0,51	0,69	0,88
BMP and activin membrane-bound inhibitor	NM_012342	1,01	1,95	0,85	1,55	1,49	1,19	NAD(P)H:quinone oxidoreductase type 3, polypeptide A2	NM_016243	1,14	0,88	0,96	0,51	0,55	0,73
transmembrane protein 45A	NM_018004	1,88	1,25	0,93	1,55	1,39	0,95	membrane cofactor protein (CD46, trophoblast-lymphocyte cross-reactive antigen)	NM_002389	0,86	0,78	0,85	0,52	0,54	1,03
WD repeat domain 1	NM_017491	1,47	1,26	0,96	1,55	1,40	1,01	phytanoyl-CoA hydroxylase (Refsum disease)	NM_006214	0,77	0,87	0,89	0,52	0,64	0,87
family with sequence similarity 38, member B	AW269818	1,38	1,56	0,95	1,56	1,45	1,48	serum/glucocorticoid regulated kinase-like	NM_013257	0,94	0,70	0,91	0,52	0,55	1,11
suppressor of variegation 4-20 homolog 1 (Drosophila)	AA056099	1,13	1,28	0,85	1,56	1,46	1,10	antigen identified by monoclonal antibody Ki-67	AU152107	0,71	0,89	0,95	0,52	0,68	0,79
RWD domain containing 3	NM_015485	1,45	1,35	0,98	1,56	1,41	1,33	protein disulfide isomerase-associated 4	BC000425	0,66	0,91	0,90	0,52	0,63	0,70
ring finger and KH domain containing 2	NM_016626	1,31	1,68	0,93	1,56	1,21	1,25	chromosome 21 open reading frame 45	NM_018944	0,77	0,97	0,93	0,52	0,59	1,05
neogenin homolog 1 (chicken)	NM_002499	0,99	1,50	0,94	1,56	1,16	1,08	epoxide hydrolase 2, cytoplasmic	AF233336	0,68	0,64	0,93	0,52	0,56	0,87
histidyl-tRNA synthetase-like	U18937	1,07	1,07	1,00	1,56	1,35	1,01	glutamate dehydrogenase 1	AI339331	0,63	0,63	0,82	0,52	0,73	1,11
zinc finger protein 134 (clone pHZ-15)	NM_003435	1,26	1,13	0,99	1,56	1,28	0,90	bleomycin hydrolase	NM_000386	0,91	0,80	0,97	0,53	0,64	0,73
ring finger protein 111	NM_017610	1,24	1,16	0,97	1,56	1,39	1,14	sterol-C4-methyl oxidase-like	U93162	0,82	0,72	0,76	0,53	0,56	0,96
collagen, type V, alpha 2	AL575735	1,12	2,09	0,86	1,56	1,73	1,15	septin 10	BF966021	0,96	1,09	0,81	0,53	0,54	0,83
farnesyltransferase, CAAX box, alpha /// farnesyltransferase, CAAX box, alpha	BG168896	1,09	0,98	1,00	1,57	1,44	1,10	3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase 1 (soluble)	NM_002130	0,72	0,77	0,91	0,53	0,66	0,80
armadillo repeat containing, X-linked 1	NM_016608	1,10	1,65	0,98	1,57	1,27	1,27	peroxisomal D3,D2-enoyl-CoA isomerase	NM_006117	0,78	0,58	0,93	0,53	0,60	0,77
folliculin-like 1	BC000055	1,49	2,01	1,00	1,57	1,24	1,42	cyclin-dependent kinase inhibitor 3 (CDK2-associated dual specificity phosphatase)	AF213033	0,96	0,85	0,93	0,53	0,70	0,87
MAX interactor 1 /// MAX interactor 1	NM_005962	1,03	1,42	1,00	1,57	1,35	1,11	acetyl-Coenzyme A acetyltransferase 1 (acetoacetyl Coenzyme A thiolase)	NM_000019	0,66	0,83	0,94	0,53	0,67	0,80
fibronectin 1	AF130095	1,31	1,36	1,05	1,57	1,63	1,14	galactose-1-phosphate uridylyltransferase	NM_000155	0,69	0,66	1,04	0,54	0,62	1,02
KIAA0753 gene product	NM_014804	0,99	1,15	1,07	1,57	1,37	1,23	cytochrome c-1	NM_001916	0,45	0,72	1,01	0,54	0,65	0,85
G protein-coupled receptor, family C, group 5, member C	NM_022036	1,16	1,16	0,92	1,57	1,37	1,37	GPAA1P anchor attachment protein 1 homolog (yeast)	NM_003801	0,84	0,93	0,94	0,54	0,63	0,73
RAN binding protein 6	AI123233	1,60	1,26	1,01	1,58	1,55	1,10	apataxin	NM_017692	0,70	0,81	0,92	0,54	0,58	0,87
G patch domain containing 2	NM_018040	1,11	1,00	1,12	1,58	1,47	1,01	acetyl-Coenzyme A acetyltransferase 2 (acetoacetyl Coenzyme A thiolase)	BC000408	0,66	0,78	0,76	0,54	0,57	0,77
coactosin-like 1 (Dictyostelium)	NM_021615	2,22	1,29	1,07	1,58	1,27	0,95	interleukin-1 receptor-associated kinase 1	NM_001569	0,89	0,89	0,98	0,54	0,60	0,70
SEC11-like 1 (S. cerevisiae)	NM_014300	0,90	1,21	0,88	1,58	1,36	0,88	dihydropyrimidine dehydrogenase	NM_000110	0,54	0,83	0,92	0,54	0,71	0,67
Paraspeckle component 1	AL049263	1,19	1,18	1,00	1,58	1,48	1,12	primase, polypeptide 1, 49kDa	NM_000946	0,82	1,11	1,01	0,55	0,71	0,76
tensin-like SH2 domain containing 1	NM_022748	1,51	1,84	0,95	1,58	1,48	1,46	biphenyl hydrolase-like (serine hydrolase; breast epithelial mucin-associated antigen)	NM_004332	0,94	1,01	0,93	0,55	0,57	1,09
T-cell immunomodulatory protein /// T-cell immunomodulatory protein	NM_030790	1,43	1,48	1,00	1,58	1,44	1,23	serum amyloid A4, constitutive	NM_006512	0,25	0,17	0,81	0,55	0,80	0,70
retinoic acid induced 17	AF070622	1,20	1,43	0,89	1,58	1,45	1,31	solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; oxoglutarate carrier), member 11	NM_003562	0,51	0,84	0,93	0,55	0,64	0,82
platelet-activating factor acetylhydrolase, isoform lb, gamma subunit 29kDa	NM_002573	1,13	1,67	1,06	1,58	1,38	1,16	McKusick-Kaufman syndrome	NM_018848	0,72	1,10	0,95	0,55	0,69	0,96
ankyrin repeat domain 12	AW572909	1,17	1,08	1,01	1,58	1,36	1,14	fibroblast growth factor receptor 4	NM_002011	0,65	0,70	0,87	0,55	0,61	0,76
guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha inhibiting activity polypeptide 1	AL049933	1,32	1,64	0,92	1,59	1,42	1,00	3-hydroxymethyl-3-methylglutaryl-Coenzyme A lyase (hydroxymethylglutaciduria)	NM_000191	0,87	0,94	0,98	0,55	0,62	1,09

Die Genexpression ist als x-fache Veränderung im Vergleich zu unbehandelten Zellen angegeben



## Fortsetzung Tabelle A: Gene, durch IGF1R-Reduktion aber nicht durch nonsense siRNA im Vergleich zu unbehandelten Zellen signifikant und biologisch relevant reguliert

Gen	'gene bank accession no.'	IGF-II ds1	IGF-II ds3	INSR ds1	IGF1R ds3	Rez. Mix	nonsens e siRNA	Gen	'gene bank accession no.'	IGF-II ds1	IGF-II ds3	INSR ds1	IGF1R ds3	Rez. Mix	nonsense siRNA
centrosome spindle pole associated protein	NM_024790	1,26	1,56	0,98	1,59	1,44	1,19	mitogen-activated protein kinase 9	W37431	0,85	1,01	0,83	0,55	0,62	1,02
Disabled homolog 2, mitogen-responsive phosphoprotein (Drosophila)	N21202	1,57	1,25	0,97	1,59	1,36	1,05	butyrophilin, subfamily 3, member A2	BC002832	0,91	0,65	0,97	0,55	0,62	0,72
family with sequence similarity 46, member A	AW246673	1,91	2,25	0,95	1,59	1,44	1,22	aurora kinase B	AB011446	0,79	1,00	0,89	0,55	0,72	0,79
guanylate binding protein 2, interferon-inducible /// guanylate binding protein 2, interferon-inducible	NM_004120	1,18	0,99	0,93	1,60	1,44	0,86	COMM domain containing 8	NM_017845	0,86	0,85	0,88	0,56	0,75	0,87
myo-inositol monophosphatase A3	NM_017813	1,16	0,89	0,97	1,60	1,33	1,13	adiponutrin	NM_025225	0,70	0,88	0,75	0,56	0,59	0,78
chromosome 10 open reading frame 38	AU150943	1,13	1,69	0,92	1,60	1,29	0,90	exosome component 2	BC000747	0,71	0,76	0,98	0,56	0,61	0,68
DRE1 protein	NM_017644	1,04	1,07	1,08	1,60	1,25	1,07	DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 3 beta	NM_006892	0,84	0,93	0,96	0,56	0,65	1,35
zinc finger protein 435	NM_025231	1,23	1,47	0,98	1,60	1,34	1,00	chromosome 21 open reading frame 33	NM_004649	0,81	0,92	0,98	0,56	0,59	0,83
RAB17, member RAS oncogene family	NM_022449	1,15	0,98	1,05	1,60	1,46	1,42	START domain containing 7 /// START domain containing 7	NM_020151	0,83	0,91	0,95	0,56	0,70	1,01
killer cell lectin-like receptor subfamily C, member 3	NM_002261	0,98	0,73	1,03	1,60	1,29	0,94	outer mitochondrial membrane cytochrome b5	AW235051	0,90	0,85	0,80	0,56	0,61	0,88
kinesin family member 3C	AF035621	1,73	1,72	1,06	1,61	1,34	1,15	selenoprotein X, 1	NM_016332	0,78	0,60	0,91	0,56	0,66	0,80
motile sperm domain containing 1	NM_019556	1,86	1,31	0,89	1,61	1,36	1,23	phosphatidylinositol glycan, class F	NM_002643	0,91	0,76	0,92	0,56	0,63	0,88
bone morphogenetic protein 1	NM_006129	1,42	1,21	1,00	1,61	1,46	1,16	L-3-hydroxyacyl-Coenzyme A dehydrogenase, short chain	BC000306	0,62	0,86	0,91	0,57	0,68	0,89
calponin 2	NM_004368	1,99	1,70	0,96	1,61	1,34	1,21	coronin, actin binding protein, 2A	NM_003389	0,73	0,68	0,90	0,57	0,67	1,38
Yes-associated protein 1, 65kDa	A1745185	1,35	1,00	0,96	1,61	1,35	0,91	thiosulfate sulfurtransferase (rhodanese)	D87292	0,61	0,78	1,04	0,57	0,72	1,11
collagen, type IV, alpha 5 (Alport syndrome)	AW052179	1,44	1,74	0,93	1,61	1,49	0,99	N-acetylneuraminic acid synthase (sialic acid synthase)	NM_018946	0,54	0,75	0,89	0,57	0,62	0,69
reticulocalbin 2, EF-hand calcium binding domain	BC004892	0,91	1,41	0,86	1,61	1,33	1,15	Fukuyama type congenital muscular dystrophy (fukutin)	NM_006731	0,87	0,86	0,89	0,57	0,67	0,89
cyclin B1 interacting protein 1	NM_021178	1,08	0,84	0,94	1,61	1,21	1,16	immature colon carcinoma transcript 1	NM_001545	0,79	0,73	0,94	0,57	0,64	0,69
very low density lipoprotein receptor	L22431	1,74	1,09	1,17	1,61	1,24	1,10	ELOVL family member 6, elongation of long chain fatty acids (FEN1/Elo2, SUR4/Elo3-like, yeast)	NM_024090	0,85	0,98	0,86	0,57	0,62	0,88
NCK adaptor protein 2	BC000103	1,54	1,65	0,84	1,61	1,35	1,27	erythrocyte membrane protein band 4.1 like 4B	NM_019114	0,71	0,52	0,94	0,57	0,69	0,92
actin, gamma 2, smooth muscle, enteric	NM_001615	1,19	1,74	1,01	1,61	1,26	1,06	cyclin A2	NM_001237	0,81	0,73	0,89	0,57	0,79	0,76
dehydrogenase/reductase (SDR family) member 3	NM_004753	0,98	0,86	0,95	1,61	1,39	1,35	ribonuclease H2, large subunit	NM_006397	0,84	1,07	0,90	0,57	0,65	0,75
internexin neuronal intermediate filament protein, alpha	NM_004692	1,11	1,28	1,05	1,62	1,31	1,04	CDNA FLJ42949 fis, clone BRSTN2006583	AL109716	0,69	0,64	0,78	0,57	0,61	0,87
grancalcin, EF-hand calcium binding protein /// grancalcin, EF-hand calcium binding protein	NM_012198	0,94	1,59	0,86	1,62	1,28	1,35	NHL repeat containing 2	NM_017687	0,77	0,94	0,88	0,57	0,61	0,95
Desmoglein 2	NM_001943	2,12	1,66	0,93	1,62	1,42	1,43	phosphoribosylaminoimidazole carboxylase, phosphoribosylaminoimidazole succinocarboxamide synthetase	AA902652	0,68	0,77	0,86	0,58	0,65	0,68
SH3 domain binding glutamic acid-rich protein like 3 /// SH3 domain binding glutamic acid-rich protein like 3	NM_031286	1,84	1,14	0,86	1,62	1,44	1,06	enoyl Coenzyme A hydratase domain containing 3	NM_024693	0,58	0,79	0,91	0,58	0,61	1,14
protein kinase (cAMP-dependent, catalytic) inhibitor alpha	NM_006823	1,21	2,47	0,77	1,62	1,31	1,29	SLC2A4 regulator	BE898559	0,64	0,68	0,74	0,58	0,72	0,79
prolactin	NM_000948	1,24	1,46	1,16	1,62	1,43	1,01	phenylalanine hydroxylase	NM_000277	0,54	0,85	0,83	0,58	0,65	0,78
zinc finger protein 426	NM_024106	1,18	1,12	0,94	1,62	1,38	0,80	NAD(P)H dehydrogenase, quinone 1	AI039874	0,80	0,46	0,87	0,58	0,66	0,73
hypothetical protein FLJ13710	BG163478	1,37	1,18	1,12	1,63	1,41	1,08	solute carrier family 25 (carnitine/acylcarnitine translocase), member 20	BC001689	0,55	0,56	0,94	0,58	0,64	0,75
PRP3 pre-mRNA processing factor 3 homolog (yeast)	NM_004698	0,97	1,00	1,01	1,63	1,51	0,84	homogentisate 1,2-dioxygenase (homogentisate oxidase)	NM_000187	0,65	0,74	0,93	0,58	0,63	0,82
RAB33B, member RAS oncogene family /// RAB33B, member RAS oncogene family	NM_031296	1,06	1,28	0,95	1,63	1,33	1,27	uncoupling protein 2 (mitochondrial, proton carrier)	U94592	1,00	0,88	0,81	0,59	0,62	0,90
KIAA0831	NM_014924	1,31	1,07	0,96	1,63	1,33	1,14	tetratricopeptide repeat domain 15	NM_016030	0,84	0,84	0,96	0,59	0,62	0,71
SET binding protein 1	NM_015559	1,21	1,08	0,96	1,64	1,59	1,40	KIAA0664 protein	AB014564	0,67	0,65	1,00	0,59	0,75	0,73
interferon gamma receptor 2 (interferon gamma transducer 1)	NM_005534	1,37	1,34	1,02	1,64	1,50	1,47	nucleobindin 2	NM_005013	0,94	0,94	0,93	0,59	0,68	0,83
growth factor receptor-bound protein 10	D86962	1,23	1,48	0,91	1,64	1,31	1,12	sialidase 1 (lysosomal sialidase)	U84246	1,23	0,99	0,79	0,59	0,54	1,30
fibronectin leucine rich transmembrane protein 2	NM_013231	1,41	1,85	1,00	1,65	1,57	0,92	asparagine-linked glycosylation 6 homolog (yeast, alpha-1,3-glucosyltransferase)	NM_013339	0,89	0,76	0,92	0,59	0,63	0,81
hypothetical protein FLJ20729	NM_017953	1,49	0,98	1,10	1,65	1,56	1,08	queuine tRNA-ribosyltransferase 1 (tRNA-guanine transglycosylase) /// queuine tRNA-ribosyltransferase 1 (tRNA-guanine transglycosylase)	NM_031209	0,76	0,87	1,02	0,59	0,63	0,85

Die Genexpression ist als x-fache Veränderung im Vergleich zu unbehandelten Zellen angegeben



## Fortsetzung Tabelle A: Gene, durch IGF1R-Reduktion aber nicht durch nonsense siRNA im Vergleich zu unbehandelten Zellen signifikant und biologisch relevant reguliert

Gen	'gene bank accession no.'	IGF-II ds1	IGF-II ds3	INSR ds1	IGF1R ds3	Rez. Mix	nonsense siRNA	Gen	'gene bank accession no.'	IGF-II ds1	IGF-II ds3	INSR ds1	IGF1R ds3	Rez. Mix	nonsense siRNA
thymosin-like 8	NM_021992	1,09	2,34	1,05	1,65	1,33	1,25	Cell division cycle 2, G1 to S and G2 to M	AL524035	1,00	1,17	0,94	0,59	0,75	0,93
cofactor required for Sp1 transcriptional activation, subunit 6, 77kDa	AF105421	1,21	1,30	1,01	1,65	1,44	1,16	adenylosuccinate synthase	AA628948	1,04	0,99	0,90	0,59	0,67	0,82
Rho-related BTB domain containing 1	AB018283	1,86	1,85	0,94	1,65	1,26	0,98	signal peptidase complex subunit 3 homolog (S. cerevisiae)	NM_021928	0,96	0,72	0,95	0,59	0,64	0,73
RNA binding motif, single stranded interacting protein 1	NM_016839	1,99	1,59	0,84	1,65	1,47	1,42	nuclear receptor subfamily 1, group H, member 3	NM_005693	0,68	0,61	0,93	0,59	0,70	0,71
C-type lectin domain family 2, member B	BC005254	1,26	1,42	1,10	1,65	1,64	0,94	two pore segment channel 1	NM_017901	1,10	0,68	0,99	0,59	0,62	0,98
bromodomain adjacent to zinc finger domain, 2B	NM_013450	1,36	1,47	1,06	1,65	1,42	1,23	golgi phosphoprotein 2	NM_016548	0,95	1,21	0,84	0,59	0,59	1,14
pogo transposable element with ZNF domain	AB007930	1,16	1,45	0,97	1,65	1,46	1,18	RA-regulated nuclear matrix-associated protein	AK001261	0,77	1,18	0,91	0,59	0,77	0,79
low density lipoprotein receptor-related protein 10	NM_014045	1,65	1,14	1,06	1,65	1,50	1,12	NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 7, 20kDa (NADH-coenzyme Q reductase) /// NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 7, 20kDa (NADH-coenzyme Q reductase)	BC005954	0,84	0,83	0,93	0,59	0,64	1,03
keratin 19	NM_002276	2,88	1,77	1,25	1,65	1,44	1,00	LYRIC/3D3	AI886796	0,59	0,72	0,92	0,59	0,70	0,73
SH3-domain binding protein 4	AF015043	1,42	1,42	0,93	1,66	1,38	1,41	hydroxymethylbilane synthase	NM_000190	0,86	0,87	0,90	0,60	0,65	0,83
zinc finger protein 140 (clone pHZ-39)	NM_003440	1,22	1,26	0,97	1,66	1,30	0,99	NFS1 nitrogen fixation 1 (S. cerevisiae)	NM_021100	0,63	0,53	0,94	0,60	0,68	0,68
fibronectin type III domain containing 3B	NM_022763	1,02	0,91	1,01	1,67	1,60	1,07	ATPase, Class V, type 10D	AI478147	0,68	0,75	0,85	0,60	0,62	0,90
actin, alpha, cardiac muscle	NM_005159	1,17	2,10	1,00	1,67	1,34	1,07	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 18	NM_006773	0,80	0,83	1,01	0,60	0,72	0,72
son of sevenless homolog 1 (Drosophila)	L13857	1,31	1,26	1,07	1,68	1,69	1,27	NADH dehydrogenase (ubiquinone) flavoprotein 1, 51kDa	AF092131	0,71	0,86	0,96	0,60	0,69	0,98
enabled homolog (Drosophila)	NM_018212	1,39	1,44	0,86	1,68	1,45	1,14	ligatin	NM_006893	0,71	0,78	1,02	0,60	0,68	0,73
AT rich interactive domain 4B (RBP1-like) /// AT rich interactive domain 4B (RBP1-like)	NM_016374	1,26	1,54	0,93	1,68	1,49	1,09	small nuclear ribonucleoprotein polypeptide C	NM_003093	0,89	0,88	0,95	0,60	0,72	0,88
solute carrier family 39 (zinc transporter), member 6	AI635449	1,26	1,36	1,04	1,68	1,45	1,06	chromosome 14 open reading frame 94	NM_017815	0,87	0,86	0,98	0,61	0,68	0,96
myosin, heavy polypeptide 9, non-muscle	AI827941	1,91	1,59	0,87	1,68	1,45	1,30	carbonic reductase 4	AL049442	0,95	1,15	1,01	0,61	0,79	0,97
death-associated protein kinase 1	NM_004938	0,98	1,49	0,95	1,68	1,60	1,17	A kinase (PRKA) anchor protein 2 /// PALM2-AKAP2 protein	NM_007203	0,64	0,64	0,80	0,61	0,68	0,70
trophoblast glycoprotein	NM_006670	1,65	1,41	0,93	1,68	1,34	1,48	PDZ binding kinase	NM_018492	0,76	0,88	0,96	0,61	0,76	0,91
homer homolog 3 (Drosophila)	NM_004838	1,31	1,66	0,95	1,68	1,50	1,16	phospholysine phosphohistidine inorganic pyrophosphate phosphatase	NM_022126	0,85	0,79	0,83	0,61	0,65	0,92
microtubule associated monooxygenase, calponin and LIM domain containing 1	NM_022765	2,17	1,71	1,05	1,69	1,24	1,20	farnesyl-diphosphate farnesyltransferase 1	AA872727	0,72	0,86	0,77	0,61	0,62	0,83
unc-51-like kinase 1 (C. elegans)	AB018265	1,28	1,64	0,94	1,69	1,46	1,21	cytoplasmic FMR1 interacting protein 1	BC005097	0,96	0,97	0,86	0,61	0,65	1,05
thymosin, beta 10	NM_021103	1,45	1,29	0,96	1,69	1,53	0,83	hypothetical protein FLJ21918	NM_024939	1,01	0,85	0,98	0,61	0,65	0,99
drebrin 1	NM_004395	1,54	1,75	0,85	1,69	1,57	0,88	nidogen (enactin)	BF940043	0,87	1,11	0,74	0,61	0,75	0,89
zinc finger protein 74 (Cos52)	NM_003426	1,20	1,36	0,95	1,70	1,38	1,33	galactokinase 1	BG474736	0,75	0,75	0,94	0,61	0,70	0,98
polo-like kinase 2 (Drosophila)	NM_006622	2,04	1,54	1,04	1,70	1,28	0,91	chromosome condensation protein G	NM_022346	0,67	0,99	0,91	0,61	0,71	0,69
glycoprotein (transmembrane) nmb	NM_002510	0,96	0,87	0,97	1,70	1,28	0,81	opioid receptor, sigma 1	NM_005866	0,66	0,77	0,87	0,61	0,64	0,74
tumor protein p53 binding protein, 2	NM_005426	1,30	1,47	0,99	1,70	1,36	1,45	zinc finger, MYND domain containing 11	BE250417	1,22	1,39	0,97	0,61	0,65	1,32
hypothetical protein FLJ10404	NM_019057	1,08	1,24	0,97	1,70	1,58	1,21	transferrin	NM_001063	0,60	0,61	0,90	0,62	0,69	0,92
zinc finger protein 274	NM_016325	1,38	1,24	0,96	1,70	1,38	1,01	popeye domain containing 3	NM_022361	0,71	0,88	0,80	0,62	0,62	0,89
solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; adenine nucleotide translocator), member 6	AA916851	0,92	1,23	0,96	1,70	1,38	1,00	prohibitin 2	NM_007273	0,71	0,80	0,94	0,62	0,66	0,83
granzyme K (serine protease, granzyme 3; trypsin II) /// granzyme K (serine protease, granzyme 3; trypsin II)	NM_002104	1,03	0,91	1,08	1,71	1,44	0,97	proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type, 10	NM_002801	0,75	0,69	1,13	0,62	0,69	0,91
sodium channel, voltage-gated, type IX, alpha	NM_002977	1,65	1,36	1,00	1,71	1,48	1,29	hypothetical protein FLJ20364	AF269167	0,52	0,85	1,02	0,62	0,74	0,74
solute carrier family 38, member 2	NM_018573	1,23	1,26	0,92	1,72	1,46	1,06	arylacetamide deacetylase (esterase)	NM_001086	0,67	0,71	1,08	0,62	0,83	0,92
SRB7 suppressor of RNA polymerase B homolog (yeast)	AI688580	1,42	1,15	0,97	1,72	1,50	1,04	inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase A	NM_002220	0,74	0,65	1,00	0,62	0,69	1,11
Rap guanine nucleotide exchange factor (GEF) 2	BF439282	1,33	1,22	0,98	1,72	1,55	1,28	ER degradation enhancer, mannosidase alpha-like 1	NM_014674	0,92	0,73	0,92	0,62	0,70	0,99
related RAS viral (r-ras) oncogene homolog 2	NM_012250	1,41	1,06	0,92	1,72	1,44	1,11	protein kinase, DNA-activated, catalytic polypeptide	U47077	0,73	0,94	0,94	0,62	0,73	0,78
phosphoglycerate dehydrogenase	NM_006623	0,68	1,38	0,87	1,73	1,46	0,85	hypothetical protein MGC21416	BE673723	0,95	1,15	0,96	0,62	0,67	0,96
vacuolar protein sorting 54 (yeast)	NM_016516	1,07	0,95	1,09	1,73	1,67	1,18	kinesin family member 14	NM_014875	0,91	0,97	0,80	0,62	0,76	0,79
alpha thalassemia/mental retardation syndrome X-linked (RAD54 homolog, S. cerevisiae)	AI650257	1,35	1,48	0,90	1,73	1,58	1,10	aldehyde dehydrogenase 6 family, member A1	BG399778	0,68	0,79	0,84	0,62	0,72	0,78

Die Genexpression ist als x-fache Veränderung im Vergleich zu unbehandelten Zellen angegeben



## Fortsetzung Tabelle A: Gene, durch IGF1R-Reduktion aber nicht durch nonsense siRNA im Vergleich zu unbehandelten Zellen signifikant und biologisch relevant reguliert

Gen	'gene bank accession no.'	IGF-II ds1	IGF-II ds3	INSR ds1	IGF1R ds3	Rez. Mix	nonsens e siRNA	Gen	'gene bank accession no.'	IGF-II ds1	IGF-II ds3	INSR ds1	IGF1R ds3	Rez. Mix	nonsense siRNA
heme oxygenase (decycling) 1	NM_002133	0,94	0,70	0,89	1,74	1,17	1,13	polymerase (DNA directed), epsilon 2 (p59 subunit)	NM_002692	0,81	0,78	0,93	0,62	0,73	0,83
zinc finger protein 84 (HPF2)	NM_003428	1,35	1,36	1,13	1,74	1,50	0,97	deoxythymidylate kinase (thymidylate kinase)	NM_012145	0,71	0,90	0,99	0,62	0,70	0,74
TPA-induced transmembrane protein	NM_024616	1,54	1,25	0,84	1,74	1,16	1,28	origin recognition complex, subunit 3-like (yeast)	AF125507	0,92	0,83	0,93	0,62	0,76	0,74
dickkopf homolog 1 (Xenopus laevis)	NM_012242	1,61	2,19	1,33	1,74	1,73	1,17	coenzyme Q3 homolog, methyltransferase (yeast) /// coenzyme Q3 homolog, methyltransferase (yeast)	NM_017421	0,78	0,74	0,95	0,62	0,76	0,72
G protein-coupled receptor 37 (endothelin receptor type B-like)	U87460	1,39	1,33	1,06	1,74	1,49	1,09	RNA-binding region (RNP1, RRM) containing 1 /// RNA-binding region (RNP1, RRM) containing 1	AL109955	0,77	1,04	0,95	0,62	0,67	0,88
EPM2A (laforin) interacting protein 1	NM_014805	1,17	1,35	1,01	1,74	1,66	0,96	Yip1 interacting factor homolog (S. cerevisiae)	NM_020470	0,79	0,92	0,89	0,62	0,66	0,85
DKFZP564B147 protein	NM_015582	1,27	1,27	0,86	1,75	1,53	0,88	MCM6 minichromosome maintenance deficient 6 (MIS5 homolog, S. pombe) (S. cerevisiae)	NM_005915	0,83	1,13	0,93	0,62	0,78	0,86
cadherin 6, type 2, K-cadherin (fetal kidney)	NM_004932	1,93	2,12	1,09	1,75	1,54	1,46	KIAA0376 protein	AB002374	1,03	1,02	0,90	0,62	0,68	0,98
maternal G10 transcript	NM_003910	0,96	0,96	0,93	1,75	1,51	1,07	inhibitor of Bruton agammaglobulinemia tyrosine kinase	AF235049	1,07	0,88	0,85	0,62	0,69	0,97
tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (erythroid potentiating activity, collagenase inhibitor)	NM_003254	2,89	1,67	1,03	1,75	1,45	1,40	sema domain, immunoglobulin domain (Ig), transmembrane domain (TM) and short cytoplasmic domain, (semaphorin) 4G	NM_018121	0,86	0,60	0,90	0,62	0,73	0,87
sema domain, immunoglobulin domain (Ig), short basic domain, secreted, (semaphorin) 3C	AI962897	1,69	1,08	1,08	1,76	1,32	1,08	ATPase, H+ transporting, lysosomal 70kDa, V1 subunit A	NM_001690	0,79	0,74	0,85	0,62	0,78	0,85
activity-dependent neuroprotector	NM_015339	1,19	1,46	0,94	1,76	1,61	1,09	1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase 5 (lysophosphatidic acid acyltransferase, epsilon)	NM_018361	0,95	0,94	0,98	0,62	0,69	0,87
growth factor receptor-bound protein 14	NM_004490	0,87	1,31	0,92	1,77	1,56	0,81	anaphase promoting complex subunit 5 /// anaphase promoting complex subunit 5	T33068	0,76	0,88	0,93	0,62	0,70	0,83
neuronal cell adhesion molecule	NM_005010	1,28	1,85	1,01	1,77	1,46	1,22	serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade F (alpha-2 antipain, pigment epithelium derived factor), member 2	NM_000934	0,83	0,66	0,85	0,62	0,80	1,08
Rho family GTPase 1	U69563	1,74	1,16	0,97	1,77	1,43	1,02	sema domain, transmembrane domain (TM), and cytoplasmic domain, (semaphorin) 6B	NM_020241	0,69	0,68	0,88	0,62	0,67	0,70
KIBRA protein	AB020676	1,41	1,10	1,07	1,77	1,62	1,44	seven transmembrane domain protein	NM_006326	0,85	1,00	0,97	0,63	0,63	1,06
F-box protein 46	NM_012066	1,15	1,15	1,03	1,78	1,54	1,03	interferon regulatory factor 3	NM_001571	0,88	0,82	0,99	0,63	0,69	0,79
limitrin	AW888223	2,46	1,88	0,92	1,78	1,49	1,22	cutC copper transporter homolog (E.coli)	NM_015960	0,75	0,81	0,93	0,63	0,66	0,93
TCDD-inducible poly(ADP-ribose) polymerase	AL556438	1,04	1,24	0,86	1,78	1,52	1,20	solute carrier family 39 (zinc transporter), member 14	D31887	0,74	0,66	0,81	0,63	0,68	0,89
granulin	NM_002087	1,35	1,40	0,92	1,79	1,50	1,29	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 12	AI446530	0,69	0,77	0,88	0,63	0,69	0,73
E74-like factor 3 (ets domain transcription factor, epithelial-specific)	AF017307	1,45	1,13	0,88	1,79	1,56	1,35	malic enzyme 2, NAD(+)-dependent, mitochondrial	BC000147	0,70	1,07	0,91	0,63	0,72	1,11
growth arrest and DNA-damage-inducible, beta	NM_015675	1,68	1,19	1,04	1,79	1,55	1,39	ceramide kinase	NM_022766	1,02	1,31	0,86	0,63	0,66	1,20
activating transcription factor 3	NM_001674	1,46	1,23	1,00	1,79	1,19	1,25	mitochondrial ribosomal protein L17	AK026857	0,83	0,81	1,03	0,63	0,79	0,77
S100 calcium binding protein A6 (calcyclin)	NM_014624	4,26	1,02	0,91	1,79	1,56	1,08	aminomethyltransferase (glycine cleavage system protein T)	NM_000481	0,90	0,88	0,95	0,63	0,68	0,83
protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 15A	NM_014330	1,31	1,42	0,96	1,80	1,37	1,17	poly (ADP-ribose) polymerase family, member 1	M32721	0,73	1,00	0,85	0,63	0,71	0,76
jumonji domain containing 1C	AI694023	1,15	1,23	0,88	1,80	1,54	1,08	MpV17 transgene, murine homolog, glomerulosclerosis	NM_002437	0,81	0,73	0,97	0,63	0,67	0,74
membrane protein, palmitoylated 6 (MAGUK p55 subfamily member 6)	NM_016447	1,17	1,54	1,03	1,80	1,87	1,21	hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 12	NM_016142	0,74	1,03	0,83	0,63	0,68	0,81
headcase homolog (Drosophila)	NM_016217	1,51	1,55	0,96	1,81	1,52	1,27	annexin A9	AF230929	0,54	0,63	0,85	0,63	0,75	0,70
DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box polypeptide 40	BF431360	0,65	1,33	0,80	1,81	1,46	1,28	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 6	AF308472	0,74	0,78	0,94	0,63	0,67	1,07
tissue inhibitor of metalloproteinase 2	NM_003255	2,24	1,49	1,09	1,83	1,46	1,13	solute carrier family 37 (glycerol-6-phosphate transporter), member 4	NM_001467	0,71	0,88	0,92	0,63	0,67	1,22
H2A histone family, member Y2	NM_018649	1,21	1,38	0,99	1,83	1,49	1,07	lanosterol synthase (2,3-oxidosqualene-lanosterol cyclase)	AW084510	0,73	0,78	0,83	0,63	0,67	0,79
slit homolog 2 (Drosophila)	AF055585	1,27	2,90	1,09	1,83	1,77	1,47	retinol dehydrogenase 11 (all-trans and 9-cis)	AL096716	0,99	1,14	0,79	0,63	0,74	0,94
nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 4	NM_019094	0,85	1,31	0,99	1,83	1,47	1,11	N-acylsphingosine amidohydrolase (acid ceramidase)-like	AK024677	0,86	0,87	0,93	0,63	0,72	0,86
CDC-like kinase 1	AI251890	1,23	1,27	0,97	1,84	1,54	1,13	COP9 constitutive photomorphogenic homolog subunit 7A (Arabidopsis)	AF193844	0,78	0,81	0,89	0,63	0,71	0,82
protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 12B	AF324888	1,14	1,06	1,03	1,84	1,42	1,18	annexin A7	NM_004034	0,96	0,76	0,90	0,63	0,74	0,91
Ras-like without CAAX 1	AF084462	1,45	1,17	1,02	1,84	1,45	1,00	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 39	NM_005804	0,72	0,97	0,91	0,63	0,68	0,79
protein kinase C binding protein 1	NM_018634	1,19	1,12	0,97	1,84	1,69	0,81	CDC42 effector protein (Rho GTPase binding) 4	AL162074	0,89	0,95	0,80	0,64	0,65	0,95
nucleoredoxin	NM_017821	1,40	2,59	0,96	1,84	1,58	1,18	tubulin, gamma 1	NM_001070	0,68	0,74	0,93	0,64	0,73	0,73

Die Genexpression ist als x-fache Veränderung im Vergleich zu unbehandelten Zellen angegeben



## Fortsetzung Tabelle A: Gene, durch IGF1R-Reduktion aber nicht durch nonsense siRNA im Vergleich zu unbehandelten Zellen signifikant und biologisch relevant reguliert

Gen	'gene bank accession no.'	IGF-II ds1	IGF-II ds3	INSR ds1	IGF1R ds3	Rez. Mix	nonsens e siRNA	Gen	'gene bank accession no.'	IGF-II ds1	IGF-II ds3	INSR ds1	IGF1R ds3	Rez. Mix	nonsense siRNA
zinc finger protein 85 (HPF4, HTF1)	NM_003429	1,49	1,67	0,88	1,85	1,45	0,97	F-box protein 5	NM_012177	0,88	1,11	0,93	0,64	0,74	0,89
ectodermal-neural cortex (with BTB-like domain)	AF010314	1,46	1,40	0,93	1,85	1,45	1,23	dudulin 2	NM_018234	1,01	0,90	0,95	0,64	0,71	0,86
histone deacetylase 5	NM_005474	0,98	1,04	1,06	1,85	1,64	1,21	seryl-tRNA synthetase 2	NM_017827	0,86	0,87	0,94	0,64	0,63	0,92
formin binding protein 1-like	AW270932	1,67	1,83	0,82	1,85	1,46	1,19	ATPase, Ca++ transporting, plasma membrane 2	R52647	0,58	0,58	0,88	0,64	0,87	0,75
protocadherin 17	NM_014459	1,57	2,29	0,98	1,85	2,02	0,78	squalene epoxidase	AF098865	0,76	0,98	0,80	0,64	0,67	0,90
neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 9	AL136139	1,60	1,42	1,03	1,86	1,51	1,30	solute carrier family 35 (UDP-N-acetylglucosamine (UDP-GlcNAc) transporter), member A3	NM_012243	0,99	0,88	0,87	0,64	0,78	1,00
testis derived transcript (3 LIM domains)	NM_015641	1,80	1,59	0,84	1,87	1,29	1,04	complement component 4 binding protein, beta	NM_000716	0,44	0,32	0,84	0,64	0,76	0,75
cytochrome P450, family 26, subfamily B, polypeptide 1	NM_019885	2,70	3,45	1,03	1,87	1,92	1,06	nipsnap homolog 1 (C. elegans)	AW083371	0,70	0,79	0,84	0,64	0,71	0,92
tuftelin 1	NM_020127	2,22	1,38	1,03	1,87	1,53	0,73	FLJ23311 protein	NM_024680	0,83	1,03	0,88	0,64	0,76	0,78
membrane-associated ring finger (C3HC4) 3	AW593996	1,18	0,97	1,08	1,87	1,56	1,23	NIMA (never in mitosis gene a)-related kinase 7	AL080111	1,63	0,98	0,78	0,64	0,67	1,39
defensin, alpha 5, Paneth cell-specific	NM_021010	1,38	2,07	1,02	1,88	2,03	0,94	deoxyhypusine synthase	NM_001930	0,87	0,99	1,00	0,64	0,74	0,96
insulin-like growth factor 2 receptor	BG031974	1,15	1,18	0,99	1,88	1,58	0,96	asparagine-linked glycosylation 5 homolog (yeast, dolichyl-phosphate beta-glucosyltransferase)	NM_013338	0,56	0,91	0,81	0,64	0,68	0,70
Rho family GTPase 3	BG054844	1,88	1,57	1,04	1,88	1,84	1,07	dynamins 1	AF035321	1,26	0,88	0,93	0,64	0,69	0,83
Rho GDP dissociation inhibitor (GDI) beta	NM_001175	1,48	1,02	1,22	1,89	1,76	0,97	hypothetical protein FLJ11273	AV705186	0,82	1,17	0,70	0,64	0,70	0,80
pre-B-cell leukemia transcription factor interacting protein 1	NM_020524	1,44	1,37	0,96	1,89	1,53	1,34	CGI-49 protein	NM_016002	0,51	0,64	0,85	0,64	0,72	0,77
deoxyribonuclease I-like 3	NM_004944	1,22	0,89	1,15	1,90	1,65	1,03	coatamer protein complex, subunit zeta 1	NM_016057	0,84	0,54	0,80	0,64	0,71	0,75
Cyclin G2	AW134535	1,23	1,93	0,90	1,91	1,42	1,44	WD repeat domain 18	BC001648	0,83	0,87	0,89	0,64	0,68	0,83
hypothetical protein FLJ10260	NM_018042	1,40	1,42	1,00	1,92	1,59	1,33	dynactin 4 (p62)	NM_016221	0,75	1,01	0,96	0,65	0,75	0,91
CAAX box 1	NM_003928	1,48	1,34	0,91	1,93	1,77	1,03	chromosome 20 open reading frame 172	NM_024918	0,75	1,01	0,85	0,65	0,77	0,74
zyxin	NM_003461	1,83	1,17	0,84	1,93	1,46	1,40	signal recognition particle 72kDa	NM_001222	0,72	0,66	0,88	0,65	0,71	0,69
Microtubule-associated protein 1B	AL523076	1,74	2,59	1,09	1,93	1,37	0,98	hypothetical protein FLJ10407	NM_018087	0,78	0,84	0,98	0,65	0,80	0,69
vesicle amine transport protein 1 homolog (T. californica)	BC001913	1,76	1,45	0,99	1,93	1,47	1,25	Coenzyme A synthase	NM_025233	0,62	0,75	0,97	0,65	0,71	0,84
dihydropyrimidinase-like 2	NM_001386	2,05	2,12	0,85	1,94	1,67	1,20	fatty acid desaturase 2	NM_004265	0,79	0,94	0,74	0,65	0,68	0,77
protective protein for beta-galactosidase (galactosialidosis)	NM_000308	1,03	0,96	0,97	1,95	1,57	1,35	target of myb1-like 1 (chicken)	NM_005486	1,06	1,01	0,87	0,65	0,72	1,15
CK2 interacting protein 1; HQ0024c protein	NM_016274	1,77	2,18	0,88	1,95	1,50	1,30	mannose phosphate isomerase	NM_002435	0,72	0,79	0,96	0,65	0,67	0,80
UPF3 regulator of nonsense transcripts homolog B (yeast)	NM_023010	1,13	1,26	0,92	1,96	1,63	1,11	polynucleotide kinase 3'-phosphatase	NM_007254	0,90	0,95	0,96	0,65	0,64	0,85
Rho-guanine nucleotide exchange factor	NM_022448	1,13	0,95	1,04	1,96	1,66	0,97	WD40 repeat protein interacting with phospholipids of 49kDa	NM_017983	1,36	0,97	0,89	0,65	0,75	1,17
jagged 1 (Alagille syndrome)	U73936	1,10	1,63	0,81	1,97	1,54	1,22	chromosome 9 open reading frame 76	NM_024945	0,56	1,07	0,91	0,65	0,75	0,90
palmdelphin	NM_017734	1,42	2,86	0,98	1,97	2,57	0,70	MyoD family inhibitor domain containing /// MyoD family inhibitor domain containing	AF054589	0,95	0,94	0,88	0,65	0,72	0,94
pellino homolog 1 (Drosophila)	NM_020651	0,98	1,45	1,05	1,97	1,76	1,04	CD164 antigen, sialomucin	NM_006016	1,14	1,00	0,85	0,65	0,68	0,75
hypothetical protein FLJ10652	NM_018169	1,27	1,69	0,94	1,98	1,50	1,48	cadherin 1, type 1, E-cadherin (epithelial)	NM_004360	1,10	0,70	0,96	0,65	0,76	0,95
Cbp/p300-interacting transactivator, with Glu/Asp-rich carboxy-terminal domain, 2	NM_006079	1,56	1,49	0,81	1,98	1,70	0,83	glyoxylate reductase/hydroxypyruvate reductase	NM_012203	0,80	0,89	0,97	0,65	0,67	0,96
epithelial protein lost in neoplasm beta	BC001247	2,77	1,34	0,96	1,99	1,71	1,27	nitrilase 1	NM_005600	0,79	0,71	0,91	0,65	0,68	0,73
cerberus 1 homolog, cysteine knot superfamily (Xenopus laevis)	NM_005454	1,07	1,32	1,16	2,00	1,69	1,10	epithelial V-like antigen 1	NM_005797	0,74	0,55	0,87	0,65	0,73	0,76
dihydropyrimidinase-like 3	W72516	1,51	1,84	1,11	2,01	1,58	1,08	nucleolar protein 7, 27kDa	NM_016167	0,80	0,76	1,03	0,65	0,78	0,71
chimerin (chimaerin) 1	BF339445	1,19	2,17	0,92	2,01	1,46	1,06	SFRS protein kinase 1	AW082913	0,82	0,94	1,02	0,66	0,70	0,73
polypyrimidine tract binding protein 2	NM_021190	1,27	1,36	1,11	2,01	1,83	1,46	glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1-like	AA135522	0,88	1,11	0,73	0,66	0,81	0,83
jumonji domain containing 1A	AA524505	1,28	1,22	0,89	2,01	1,56	1,15	myotubularin related protein 4	AB014547	0,82	1,04	0,90	0,66	0,64	0,92
Ras-related GTP binding C	AK023373	1,14	1,15	0,97	2,03	1,43	1,40	acyl-Coenzyme A dehydrogenase, short/branched chain	NM_001609	0,75	0,69	0,98	0,66	0,78	1,10
SRY (sex determining region Y)-box 4	NM_003107	1,39	1,99	0,86	2,04	1,69	1,19	6-pyruvoyl-tetrahydropterin synthase/dimerization cofactor of hepatocyte nuclear factor 1 alpha (TCF1)	NM_000281	0,79	0,72	0,88	0,66	0,72	0,94
ring finger protein 44	NM_014901	1,60	1,98	0,96	2,05	1,73	1,27	phosphofructokinase, liver	NM_002626	0,92	0,95	0,92	0,66	0,74	0,94
adrenomedullin	NM_001124	1,20	1,67	1,25	2,06	1,72	1,06	RAN binding protein 5	AF339834	0,65	0,78	0,88	0,66	0,71	0,75
synaptotagmin XI	AA626780	1,16	1,79	0,99	2,07	1,53	1,08	cell division cycle associated 3 /// cell division cycle associated 3	NM_031299	0,87	0,82	0,95	0,66	0,83	0,88

Die Genexpression ist als x-fache Veränderung im Vergleich zu unbehandelten Zellen angegeben





## Fortsetzung Tabelle A: Gene, durch IGF1R-Reduktion aber nicht durch nonsense siRNA im Vergleich zu unbehandelten Zellen signifikant und biologisch relevant reguliert

Gen	'gene bank accession no.'	IGF-II ds1	IGF-II ds3	INSR ds1	IGF1R ds3	Rez. Mix	nonsense siRNA	Gen	'gene bank accession no.'	IGF-II ds1	IGF-II ds3	INSR ds1	IGF1R ds3	Rez. Mix	nonsense siRNA
ephrin-A4	NM_005227	1,06	1,62	0,96	2,08	1,54	1,36	nucleoporin 37kDa	NM_024057	0,72	0,74	0,89	0,66	0,71	0,69
chromosome 9 open reading frame 3	BG036668	1,31	1,62	1,10	2,08	1,99	1,20	methylcrotonoyl-Coenzyme A carboxylase 1 (alpha)	NM_020166	0,69	0,77	0,89	0,66	0,71	0,76
inositol hexaphosphate kinase 2	NM_016291	1,40	1,30	1,03	2,09	1,80	1,34	ubiquinol-cytochrome c reductase core protein I	NM_003365	0,86	0,95	0,89	0,66	0,71	0,98
SNF1-like kinase /// SNF1-like kinase	NM_030751	1,65	1,04	0,96	2,12	1,84	1,44	protein disulfide isomerase-associated 6	NM_005742	0,73	0,86	0,87	0,66	0,77	0,69
insulin receptor substrate 2	AF073310	1,36	1,82	1,06	2,12	1,94	1,15	lactamase, beta 2	NM_016027	0,85	0,87	0,86	0,66	0,77	1,19
latent transforming growth factor beta binding protein 1	AI986120	2,26	2,33	1,17	2,14	2,06	1,16	sex comb on midleg-like 1 (Drosophila)	BF001786	0,70	0,72	0,92	0,66	0,73	0,82
Jumonji, AT rich interactive domain 1B (RBP2-like)	NM_006618	1,45	1,52	0,95	2,15	1,63	1,36	ADP-ribosylation factor-like 1	BE890745	0,84	0,87	0,91	0,66	0,81	0,96
nicotinamide N-methyltransferase	NM_006169	1,20	1,25	1,08	2,16	1,77	1,15	ilvB (bacterial acetolactate synthase)-like	NM_006844	0,83	1,01	0,92	0,66	0,74	0,89
KIAA0980 protein	NM_025176	1,26	2,00	0,96	2,18	1,63	1,23	glutathione S-transferase kappa 1	NM_015917	0,94	0,74	0,91	0,66	0,71	0,90
TSPY-like 4	AL050331	0,81	1,87	0,96	2,19	1,88	1,01	5'-nucleotidase, ecto (CD73)	NM_002526	1,00	0,66	1,12	0,66	0,77	0,96
ATPase, Ca++ transporting, plasma membrane 1	L14561	1,80	2,01	0,92	2,21	1,87	1,26	inhibitor of DNA binding 4, dominant negative helix-loop-helix protein	AW157094	0,61	0,90	0,86	0,66	0,80	0,70
cysteine-rich, angiogenic inducer, 61	NM_001554	3,67	1,88	1,09	2,21	1,82	1,11	Insulin-like growth factor 1 receptor	AI830698	1,04	1,09	0,86	0,66	0,67	0,86
transforming growth factor, beta 2	M19154	1,81	1,58	1,10	2,22	1,57	1,04	FLJ20298 protein	NM_017752	0,87	0,89	0,89	0,66	0,79	0,81
proline-rich nuclear receptor coactivator 1	AF279899	1,34	1,35	0,87	2,23	1,76	1,41	AHNAK nucleoprotein (desmoyokin)	BG287862	1,31	0,93	0,88	0,66	0,74	1,32
growth differentiation factor 15	BC000529	1,07	0,63	1,07	2,23	1,93	0,90	cysteine conjugate-beta lyase; cytoplasmic (glutamine transaminase K, kynurenine aminotransferase)	NM_004059	1,10	0,91	0,93	0,66	0,73	0,81
midline 1 (Opitz/BBB syndrome)	BE967532	1,26	1,30	0,89	2,25	1,81	1,31	dehydrogenase/reductase (SDR family) member 1	AL050217	1,00	0,71	0,93	0,66	0,74	1,12
prostaglandin E receptor 4 (subtype EP4)	AI675173	1,52	4,38	0,99	2,33	2,26	1,24	myosin VC	NM_018728	0,96	1,18	0,94	0,66	0,74	1,41
insulin-like growth factor binding protein 2, 36kDa	NM_000597	2,76	2,23	0,82	2,34	2,01	1,00	lamin B receptor	NM_002296	0,82	1,14	0,82	0,66	0,73	0,87
fls485	NM_015931	1,17	0,98	1,04	2,36	1,74	1,08	dolichyl-phosphate (UDP-N-acetylglucosamine) N-acetylglucosaminophosphotransferase 1 (GlcNAc-1-P transferase)	BC000325	0,84	0,89	0,92	0,66	0,71	0,72
fibronectin leucine rich transmembrane protein 3	NM_013281	2,02	2,15	0,81	2,39	1,48	1,37	sterol O-acyltransferase 2	AF059203	0,71	0,53	1,17	0,67	0,74	1,26
BTB and CNC homology 1, basic leucine zipper transcription factor 2	AK027193	1,96	1,67	0,99	2,46	1,76	1,20	B9 protein	NM_015681	0,77	0,81	1,01	0,67	0,72	0,78
chromosome 8 open reading frame 4	NM_020130	1,34	1,99	0,90	2,49	1,98	0,74	mitochondrial ribosomal protein L39	NM_017446	0,75	0,54	0,96	0,67	0,78	0,79
cyclin-dependent kinase inhibitor 1C (p57, Kip2)	R78668	1,30	1,19	1,09	2,50	1,80	1,48	chromosome 14 open reading frame 139	NM_024633	1,00	0,70	0,95	0,67	0,73	0,97
annexin A1	NM_000700	4,74	1,23	1,11	2,51	1,87	0,96								
cystatin A (stefin A)	NM_005213	0,95	0,90	1,03	2,55	1,68	0,89								
A kinase (PRKA) anchor protein (gravin) 12	AB003476	5,16	2,71	0,94	2,67	1,64	1,43								
signal transducer and activator of transcription 4	NM_003151	1,25	1,01	1,15	2,74	1,99	1,02								
amphiregulin (schwannoma-derived growth factor)	NM_001657	1,84	6,58	0,90	2,76	2,23	1,34								
platelet derived growth factor C	NM_016205	1,93	1,96	0,85	2,79	2,17	1,14								
downregulated in ovarian cancer 1	NM_014890	1,95	2,09	0,86	2,97	1,81	1,16								
four and a half LIM domains 2	NM_001450	4,54	2,06	1,14	2,99	2,04	1,42								
I factor (complement)	NM_000204	0,64	0,63	0,81	3,00	2,25	0,91								
folliculin	NM_013409	1,35	1,85	1,00	3,25	3,63	0,80								
actin, alpha 1, skeletal muscle	NM_001100	4,03	4,18	0,96	3,35	2,00	1,39								
leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 5	AF062006	2,01	2,11	1,34	3,38	2,86	1,12								
fibrinogen-like 1	NM_004467	0,75	0,69	1,15	3,78	3,80	0,80								
chondroitin sulfate proteoglycan 2 (versican)	BF590263	4,24	4,27	0,95	3,86	2,62	1,48								
lactate dehydrogenase B	NM_002300	1,18	1,07	1,18	4,00	2,51	0,98								
calponin 1, basic, smooth muscle	NM_001299	3,98	2,61	1,02	5,32	2,70	1,46								

Die Genexpression ist als x-fache Veränderung im Vergleich zu unbehandelten Zellen angegeben





**Tabelle B: Gene, durch INSR-Reduktion aber nicht durch nonsense siRNA im Vergleich zu unbehandelten Zellen signifikant und biologisch relevant reguliert**

Gen	'gene bank accession no.'	IGF-II ds1	IGF-II ds3	INSR ds1	IGF1R ds3	Rez. Mix	nonsense siRNA	Gen	'gene bank accession no.'	IGF-II ds1	IGF-II ds3	INSR ds1	IGF1R ds3	Rez. Mix	nonsense siRNA
serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade G (C1 inhibitor), member 1, (angioedema, hereditary)	NM_000062	0,50	1,23	<b>0,54</b>	0,85	0,89	1,04	fatty acid desaturase 1	BE540552	0,53	1,09	<b>0,60</b>	0,38	0,42	0,75
paraoxonase 2	NM_000305	1,01	1,00	<b>0,54</b>	0,92	0,72	1,15	tumor differentially expressed 1 /// tumor differentially expressed 1	BC006088	0,99	0,83	<b>0,60</b>	0,80	0,67	0,98
protein tyrosine phosphatase, receptor type, K	NM_002844	1,27	1,12	<b>0,55</b>	1,44	0,99	1,14	amyloid beta (A4) precursor protein (protease nexin-II, Alzheimer disease)	NM_000484	1,30	0,91	<b>0,64</b>	1,45	1,50	0,88
centrin, EF-hand protein, 2	BC005334	0,57	0,81	<b>0,55</b>	0,98	0,79	0,80	liver-specific bHLH-Zip transcription factor	NM_015925	0,97	1,38	<b>0,66</b>	1,30	1,08	1,02
mesoderm specific transcript homolog (mouse)	NM_002402	1,32	1,55	<b>0,59</b>	1,05	0,83	1,09								



**Tabelle C: Gene, durch gleichzeitige Reduktion beider Rezeptoren aber nicht durch nonsense siRNA im Vergleich zu unbehandelten Zellen signifikant und biologisch relevant reguliert**

Gen	'gene bank accession no.'	IGF-II ds1	IGF-II ds3	INSR ds1	IGF1R ds3	Rez. Mix	nonsense siRNA	Gen	'gene bank accession no.'	IGF-II ds1	IGF-II ds3	INSR ds1	IGF1R ds3	Rez. Mix	nonsense siRNA
carboxypeptidase B2 (plasma, carboxypeptidase U)	NM_016413	0,44	0,83	1,03	1,33	1,50	0,67	mutS homolog 2, colon cancer, nonpolyposis type 1 (E. coli)	U04045	0,88	1,03	0,91	0,33	0,39	0,87
amyloid beta (A4) precursor protein (protease nexin-II, Alzheimer disease)	NM_000484	1,30	0,91	0,64	1,45	1,50	0,88	cytochrome c oxidase subunit VIIa polypeptide 2 like	NM_004718	0,98	0,83	0,90	0,38	0,40	1,15
granulin	NM_002087	1,35	1,40	0,92	1,79	1,50	1,29	LR8 protein	NM_014020	0,52	0,84	0,70	0,33	0,40	1,41
SRB7 suppressor of RNA polymerase B homolog (yeast)	AI688580	1,42	1,15	0,97	1,72	1,50	1,04	alanyl-tRNA synthetase	NM_001605	0,64	0,83	1,00	0,35	0,40	0,72
hypothetical protein FLJ10652	NM_018169	1,27	1,69	0,94	1,98	1,50	1,48	inositol(myo)-1(or 4)-monophosphatase 2	NM_014214	0,95	1,03	0,83	0,37	0,41	1,11
zinc finger protein 84 (HPF2)	NM_003428	1,35	1,36	1,13	1,74	1,50	0,97	likely ortholog of mouse hypoxia induced gene 1	NM_014056	1,04	0,82	0,83	0,34	0,42	0,94
interferon gamma receptor 2 (interferon gamma transducer 1)	NM_005534	1,37	1,34	1,02	1,64	1,50	1,47	fatty acid desaturase 1	BE540552	0,53	1,09	0,60	0,38	0,42	0,75
CK2 interacting protein 1; HQ0024c protein	NM_016274	1,77	2,18	0,88	1,95	1,50	1,30	fatty acid binding protein 1, liver	NM_001443	0,50	0,64	0,70	0,37	0,43	0,74
PRP3 pre-mRNA processing factor 3 homolog (yeast)	NM_004698	0,97	1,00	1,01	1,63	1,51	0,84	clathrin, light polypeptide (Lca)	NM_007096	0,97	0,98	0,80	0,45	0,45	0,98
maternal G10 transcript	NM_003910	0,96	0,96	0,93	1,75	1,51	1,07	HSPC009 protein	NM_014019	0,76	0,87	0,97	0,38	0,45	0,78
neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 9	AL136139	1,60	1,42	1,03	1,86	1,51	1,30	synaptobrevin-like 1	NM_005638	0,95	0,82	0,92	0,32	0,45	0,95
TCDD-inducible poly(ADP-ribose) polymerase	AL556438	1,04	1,24	0,86	1,78	1,52	1,20	solute carrier family 22 (organic cation transporter), member 18	NM_002555	0,90	0,58	1,00	0,40	0,46	0,80
headcase homolog (Drosophila)	NM_016217	1,51	1,55	0,96	1,81	1,52	1,27	biliverdin reductase B (flavin reductase (NADPH))	NM_000713	0,83	0,49	0,91	0,46	0,46	0,68
5'-nucleotidase, cytosolic II	BC001595	1,18	1,15	0,92	1,50	1,52	0,95	NAD(P)H dehydrogenase, quinone 2	NM_000904	0,57	0,53	0,92	0,42	0,48	0,78
DKFZP564B147 protein	NM_015582	1,27	1,27	0,86	1,75	1,53	0,88	male-enhanced antigen	NM_014623	0,96	0,87	0,87	0,38	0,49	0,77
pre-B-cell leukemia transcription factor interacting protein 1	NM_020524	1,44	1,37	0,96	1,89	1,53	1,34	aminoacylase 1	NM_000666	0,70	0,52	0,96	0,42	0,50	0,90
thymosin, beta 10	NM_021103	1,45	1,29	0,96	1,69	1,53	0,83	carbonic anhydrase II	M36532	0,45	0,48	0,88	0,38	0,51	0,71
tuftelin 1	NM_020127	2,22	1,38	1,03	1,87	1,53	0,73	fumarylacetoacetate hydrolase (fumarylacetoacetase)	NM_000137	0,70	0,56	0,94	0,45	0,51	0,72
synaptotagmin XI	AA626780	1,16	1,79	0,99	2,07	1,53	1,08	TAF12 RNA polymerase II, TATA box binding protein (TBP)-associated factor, 20kDa	D50544	0,86	0,82	1,00	0,46	0,51	0,79
cadherin 6, type 2, K-cadherin (fetal kidney)	NM_004932	1,93	2,12	1,09	1,75	1,54	1,46	dicarbonyl/L-xylulose reductase	NM_016286	0,63	0,69	0,90	0,43	0,52	0,86
jumonji domain containing 1C	AI694023	1,15	1,23	0,88	1,80	1,54	1,08	growth hormone inducible transmembrane protein	AL136713	0,78	0,84	0,87	0,41	0,52	0,88
ephrin-A4	NM_005227	1,06	1,62	0,96	2,08	1,54	1,36	solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; ornithine transporter) member 15	NM_014252	0,71	0,58	0,90	0,40	0,52	0,72
jagged 1 (Alagille syndrome)	U73936	1,10	1,63	0,81	1,97	1,54	1,22	transforming, acidic coiled-coil containing protein 1	NM_006283	0,86	0,84	0,84	0,42	0,53	0,71
CDC-like kinase 1	AI251890	1,23	1,27	0,97	1,84	1,54	1,13	CGI-119 protein	NM_016056	0,94	0,94	0,80	0,47	0,53	0,90
F-box protein 46	NM_012066	1,15	1,15	1,03	1,78	1,54	1,03	mitochondrial ribosomal protein L9	BC004517	0,92	0,98	0,87	0,50	0,53	0,85

Die Genexpression ist als x-fache Veränderung im Vergleich zu unbehandelten Zellen angegeben



## Fortsetzung Tabelle C: Gene, durch gleichzeitige Reduktion beider Rezeptoren aber nicht durch nonsense siRNA im Vergleich zu unbehandelten Zellen signifikant und biologisch relevant reguliert

Gen	'gene bank accession no.'	IGF-II ds1	IGF-II ds3	INSR ds1	IGF1R ds3	Rez. Mix	nonsense siRNA	Gen	'gene bank accession no.'	IGF-II ds1	IGF-II ds3	INSR ds1	IGF1R ds3	Rez. Mix	nonsense siRNA
growth arrest and DNA-damage-inducible, beta	NM_015675	1,68	1,19	1,04	1,79	1,55	1,39	membrane cofactor protein (CD46, trophoblast-lymphocyte cross-reactive antigen)	NM_002389	0,86	0,78	0,85	0,52	0,54	1,03
hematopoietically expressed homeobox	NM_001529	1,28	1,27	0,97	1,51	1,55	1,17	septin 10	BF966021	0,96	1,09	0,81	0,53	0,54	0,83
Rap guanine nucleotide exchange factor (GEF) 2	BF439282	1,33	1,22	0,98	1,72	1,55	1,28	sialidase 1 (lysosomal sialidase)	U84246	1,23	0,99	0,79	0,59	0,54	1,30
RAN binding protein 6	AI123233	1,60	1,26	1,01	1,58	1,55	1,10	NAD(P)H:quinone oxidoreductase type 3, polypeptide A2	NM_016243	1,14	0,88	0,96	0,51	0,55	0,73
hypothetical protein FLJ20729	NM_017953	1,49	0,98	1,10	1,65	1,56	1,08	phosphorylase, glycogen; liver (Hers disease, glycogen storage disease type VI)	NM_002863	0,68	0,45	0,83	0,43	0,55	1,15
jumonji domain containing 1A	AA524505	1,28	1,22	0,89	2,01	1,56	1,15	solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; citrate transporter), member 1	U25147	0,55	0,75	0,80	0,48	0,55	0,86
S100 calcium binding protein A6 (calyculin)	NM_014624	4,26	1,02	0,91	1,79	1,56	1,08	putative MAPK activating protein	AI983505	1,16	0,95	0,96	0,50	0,55	1,02
growth factor receptor-bound protein 14	NM_004490	0,87	1,31	0,92	1,77	1,56	0,81	serum/glucocorticoid regulated kinase-like	NM_013257	0,94	0,70	0,91	0,52	0,55	1,11
membrane-associated ring finger (C3HC4) 3	AW593996	1,18	0,97	1,08	1,87	1,56	1,23	pyruvate dehydrogenase complex, component X	NM_003477	0,86	0,62	0,91	0,42	0,56	0,83
E74-like factor 3 (ets domain transcription factor, epithelial-specific)	AF017307	1,45	1,13	0,88	1,79	1,56	1,35	epoxide hydrolase 2, cytoplasmic	AF233336	0,68	0,64	0,93	0,52	0,56	0,87
fibronectin leucine rich transmembrane protein 2	NM_013231	1,41	1,85	1,00	1,65	1,57	0,92	sterol-C4-methyl oxidase-like	U93162	0,82	0,72	0,76	0,53	0,56	0,96
transforming growth factor, beta 2	M19154	1,81	1,58	1,10	2,22	1,57	1,04	biphenyl hydrolase-like (serine hydrolase; breast epithelial mucin-associated antigen)	NM_004332	0,94	1,01	0,93	0,55	0,57	1,09
protective protein for beta-galactosidase (galactosialidosis)	NM_000308	1,03	0,96	0,97	1,95	1,57	1,35	phosphoglucomutase 1	NM_002633	0,75	0,78	0,96	0,45	0,57	1,18
drebrin 1	NM_004395	1,54	1,75	0,85	1,69	1,57	0,88	acetyl-Coenzyme A acetyltransferase 2 (acetoacetyl Coenzyme A thiolase)	BC000408	0,66	0,78	0,76	0,54	0,57	0,77
nucleoredoxin	NM_017821	1,40	2,59	0,96	1,84	1,58	1,18	R3H domain (binds single-stranded nucleic acids) containing	NM_015361	0,98	0,87	0,82	0,49	0,57	0,90
dihydropyrimidinase-like 3	W72516	1,51	1,84	1,11	2,01	1,58	1,08	apratatin	NM_017692	0,70	0,81	0,92	0,54	0,58	0,87
hypothetical protein FLJ10404	NM_019057	1,08	1,24	0,97	1,70	1,58	1,21	glutathione S-transferase A4	NM_001512	0,60	0,86	0,89	0,50	0,58	0,70
alpha thalassemia/mental retardation syndrome X-linked (RAD54 homolog, S. cerevisiae)	AI650257	1,35	1,48	0,90	1,73	1,58	1,10	pro-oncosis receptor inducing membrane injury gene	BG538627	1,12	0,91	0,85	0,43	0,59	0,99
insulin-like growth factor 2 receptor	BG031974	1,15	1,18	0,99	1,88	1,58	0,96	golgi phosphoprotein 2	NM_016548	0,95	1,21	0,84	0,59	0,59	1,14
hypothetical protein FLJ10260	NM_018042	1,40	1,42	1,00	1,92	1,59	1,33	adiponutrin	NM_025225	0,70	0,88	0,75	0,56	0,59	0,78
cadherin 19, type 2	NM_021153	1,27	1,57	0,99	1,51	1,59	1,17	chromosome 21 open reading frame 33	NM_004649	0,81	0,92	0,98	0,56	0,59	0,83
SET binding protein 1	NM_015559	1,21	1,08	0,96	1,64	1,59	1,40	v-myb myeloblastosis viral oncogene homolog (avian)-like 2	NM_002466	0,72	1,07	0,85	0,47	0,59	0,88
fibronectin type III domain containing 3B	NM_022763	1,02	0,91	1,01	1,67	1,60	1,07	procollagen-lysine, 2-oxoglutarate 5-dioxygenase 2	AI754404	0,85	1,24	0,96	0,46	0,59	1,08
death-associated protein kinase 1	NM_004938	0,98	1,49	0,95	1,68	1,60	1,17	chromosome 21 open reading frame 45	NM_018944	0,77	0,97	0,93	0,52	0,59	1,05
coagulation factor XIII, B polypeptide	NM_001994	0,79	0,59	1,12	1,34	1,61	0,73	hypothetical protein FLJ22390	NM_022746	0,44	0,62	0,93	0,50	0,60	0,68
activity-dependent neuroprotector	NM_015339	1,19	1,46	0,94	1,76	1,61	1,09	interleukin-1 receptor-associated kinase 1	NM_001569	0,89	0,89	0,98	0,54	0,60	0,70
KIBRA protein	AB020676	1,41	1,10	1,07	1,77	1,62	1,44	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3 pseudogene 1	NM_005758	0,84	1,07	0,96	0,47	0,60	1,16
UPF3 regulator of nonsense transcripts homolog B (yeast)	NM_023010	1,13	1,26	0,92	1,96	1,63	1,11	peroxisomal D3,D2-enoyl-CoA isomerase	NM_006117	0,78	0,58	0,93	0,53	0,60	0,77
Jumonji, AT rich interactive domain 1B (RBP2-like)	NM_006618	1,45	1,52	0,95	2,15	1,63	1,36	enoyl Coenzyme A hydratase domain containing 3	NM_024693	0,58	0,79	0,91	0,58	0,61	1,14
fibronectin 1	AF130095	1,31	1,36	1,05	1,57	1,63	1,14	CDNA FLJ42949 fis, clone BRSTN2006583	AL109716	0,69	0,64	0,78	0,57	0,61	0,87
KIAA0980 protein	NM_025176	1,26	2,00	0,96	2,18	1,63	1,23	fibroblast growth factor receptor 4	NM_002011	0,65	0,70	0,87	0,55	0,61	0,76
A kinase (PRKA) anchor protein (gravin) 12	AB003476	5,16	2,71	0,94	2,67	1,64	1,43	exosome component 2	BC000747	0,71	0,76	0,98	0,56	0,61	0,68
histone deacetylase 5	NM_005474	0,98	1,04	1,06	1,85	1,64	1,21	nuclear protein E3-3	BC002873	0,58	0,59	0,97	0,50	0,61	0,72
C-type lectin domain family 2, member B	BC005254	1,26	1,42	1,10	1,65	1,64	0,94	outer mitochondrial membrane cytochrome b5	AW235051	0,90	0,85	0,80	0,56	0,61	0,88
deoxyribonuclease I-like 3	NM_004944	1,22	0,89	1,15	1,90	1,65	1,03	NHL repeat containing 2	NM_017687	0,77	0,94	0,88	0,57	0,61	0,95
EPM2A (laforin) interacting protein 1	NM_014805	1,17	1,35	1,01	1,74	1,66	0,96	uncoupling protein 2 (mitochondrial, proton carrier)	U94592	1,00	0,88	0,81	0,59	0,62	0,90
Rho-guanine nucleotide exchange factor	NM_022448	1,13	0,95	1,04	1,96	1,66	0,97	crystallin, zeta (quinone reductase)	NM_001889	0,95	0,63	0,86	0,48	0,62	0,77
dihydropyrimidinase-like 2	NM_001386	2,05	2,12	0,85	1,94	1,67	1,20	3-hydroxymethyl-3-methylglutaryl-Coenzyme A lyase (hydroxymethylglutarylaciduria)	NM_000191	0,87	0,94	0,98	0,55	0,62	1,09
vacuolar protein sorting 54 (yeast)	NM_016516	1,07	0,95	1,09	1,73	1,67	1,18	tetratricopeptide repeat domain 15	NM_016030	0,84	0,84	0,96	0,59	0,62	0,71
cystatin A (stefin A)	NM_005213	0,95	0,90	1,03	2,55	1,68	0,89	ELOVL family member 6, elongation of long chain fatty acids (FEN1/Elo2, SUR4/Elo3-like, yeast)	NM_024090	0,85	0,98	0,86	0,57	0,62	0,88

Die Genexpression ist als x-fache Veränderung im Vergleich zu unbehandelten Zellen angegeben



## Fortsetzung Tabelle C: Gene, durch gleichzeitige Reduktion beider Rezeptoren aber nicht durch nonsense siRNA im Vergleich zu unbehandelten Zellen signifikant und biologisch relevant reguliert

Gen	'gene bank accession no.'	IGF-II ds1	IGF-II ds3	INSR ds1	IGF1R ds3	Rez. Mix	nonsense siRNA	Gen	'gene bank accession no.'	IGF-II ds1	IGF-II ds3	INSR ds1	IGF1R ds3	Rez. Mix	nonsense siRNA
SRV (sex determining region Y)-box 4	NM_003107	1,39	1,99	0,86	2,04	1,69	1,19	mitogen-activated protein kinase 9	W37431	0,85	1,01	0,83	0,55	0,62	1,02
protein kinase C binding protein 1	NM_018634	1,19	1,12	0,97	1,84	1,69	0,81	popeye domain containing 3	NM_022361	0,71	0,88	0,80	0,62	0,62	0,89
cerberus 1 homolog, cysteine knot superfamily (Xenopus laevis)	NM_005454	1,07	1,32	1,16	2,00	1,69	1,10	two pore segment channel 1	NM_017901	1,10	0,68	0,99	0,59	0,62	0,98
son of sevenless homolog 1 (Drosophila)	L13857	1,31	1,26	1,07	1,68	1,69	1,27	N-acetylneuraminic acid synthase (sialic acid synthase)	NM_018946	0,54	0,75	0,89	0,57	0,62	0,69
Cbp/p300-interacting transactivator, with Glu/Asp-rich carboxy-terminal domain, 2	NM_006079	1,56	1,49	0,81	1,98	1,70	0,83	galactose-1-phosphate uridylyltransferase	NM_000155	0,69	0,66	1,04	0,54	0,62	1,02
epithelial protein lost in neoplasm beta	BC001247	2,77	1,34	0,96	1,99	1,71	1,27	ATPase, Class V, type 10D	AI478147	0,68	0,75	0,85	0,60	0,62	0,90
adrenomedullin	NM_001124	1,20	1,67	1,25	2,06	1,72	1,06	lipase A, lysosomal acid, cholesterol esterase (Wolman disease)	NM_000235	1,08	0,98	0,83	0,69	0,62	0,89
ring finger protein 44	NM_014901	1,60	1,98	0,96	2,05	1,73	1,27	farnesyl-diphosphate farnesyltransferase 1	AA872727	0,72	0,86	0,77	0,61	0,62	0,83
dickkopf homolog 1 (Xenopus laevis)	NM_012242	1,61	2,19	1,33	1,74	1,73	1,17	butyrophilin, subfamily 3, member A2	BC002832	0,91	0,65	0,97	0,55	0,62	0,72
collagen, type V, alpha 2	AL575735	1,12	2,09	0,86	1,56	1,73	1,15	homogentisate 1,2-dioxygenase (homogentisate oxidase)	NM_000187	0,65	0,74	0,93	0,58	0,63	0,82
fts485	NM_015931	1,17	0,98	1,04	2,36	1,74	1,08	GPAAP1 anchor attachment protein 1 homolog (yeast)	NM_003801	0,84	0,93	0,94	0,54	0,63	0,73
insulin-like growth factor binding protein 1	NM_000596	0,87	0,98	0,99	1,23	1,74	0,82	queuine tRNA-ribosyltransferase 1 (tRNA-guanine transglycosylase) /// queuine tRNA-ribosyltransferase 1 (tRNA-guanine transglycosylase)	NM_031209	0,76	0,87	1,02	0,59	0,63	0,85
potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 8	BF514158	1,16	1,85	1,11	1,48	1,74	1,16	scavenger receptor class B, member 1	NM_005505	0,55	0,59	0,92	0,49	0,63	0,89
pellino homolog 1 (Drosophila)	NM_020651	0,98	1,45	1,05	1,97	1,76	1,04	phosphatidylinositol glycan, class F	NM_002643	0,91	0,76	0,92	0,56	0,63	0,88
Rho GDP dissociation inhibitor (GDI) beta	NM_001175	1,48	1,02	1,22	1,89	1,76	0,97	seven transmembrane domain protein	NM_006326	0,85	1,00	0,97	0,63	0,63	1,06
BTB and CNC homology 1, basic leucine zipper transcription factor 2	AK027193	1,96	1,67	0,99	2,46	1,76	1,20	protein disulfide isomerase-associated 4	BC000425	0,66	0,91	0,90	0,52	0,63	0,70
proline-rich nuclear receptor coactivator 1	AF279899	1,34	1,35	0,87	2,23	1,76	1,41	asparagine-linked glycosylation 6 homolog (yeast, alpha-1,3-glucosyltransferase)	NM_013339	0,89	0,76	0,92	0,59	0,63	0,81
slit homolog 2 (Drosophila)	AF055585	1,27	2,90	1,09	1,83	1,77	1,47	seryl-tRNA synthetase 2	NM_017827	0,86	0,87	0,94	0,64	0,63	0,92
nicotinamide N-methyltransferase	NM_006169	1,20	1,25	1,08	2,16	1,77	1,15	E-1 enzyme	NM_021204	0,76	0,78	0,91	0,51	0,63	0,82
CAAX box 1	NM_003928	1,48	1,34	0,91	1,93	1,77	1,03	polynucleotide kinase 3'-phosphatase	NM_007254	0,90	0,95	0,96	0,65	0,64	0,85
inositol hexaphosphate kinase 2	NM_016291	1,40	1,30	1,03	2,09	1,80	1,34	phytanoyl-CoA hydroxylase (Refsum disease)	NM_006214	0,77	0,87	0,89	0,52	0,64	0,87
cyclin-dependent kinase inhibitor 1C (p57, Kip2)	R78668	1,30	1,19	1,09	2,50	1,80	1,48	opioid receptor, sigma 1	NM_005866	0,66	0,77	0,87	0,61	0,64	0,74
midline 1 (Opitz/BBB syndrome)	BE967532	1,26	1,30	0,89	2,25	1,81	1,31	immature colon carcinoma transcript 1	NM_001545	0,79	0,73	0,94	0,57	0,64	0,69
downregulated in ovarian cancer 1	NM_014890	1,95	2,09	0,86	2,97	1,81	1,16	NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 7, 20kDa (NADH-coenzyme Q reductase) /// NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 7, 20kDa (NADH-coenzyme Q reductase)	BC005954	0,84	0,83	0,93	0,59	0,64	1,03
cysteine-rich, angiogenic inducer, 61	NM_001554	3,67	1,88	1,09	2,21	1,82	1,11	bleomycin hydrolase	NM_000386	0,91	0,80	0,97	0,53	0,64	0,73
polypyrimidine tract binding protein 2	NM_021190	1,27	1,36	1,11	2,01	1,83	1,46	myotubularin related protein 4	AB014547	0,82	1,04	0,90	0,66	0,64	0,92
Rho family GTPase 3	BG054844	1,88	1,57	1,04	1,88	1,84	1,07	signal peptidase complex subunit 3 homolog (S. cerevisiae)	NM_021928	0,96	0,72	0,95	0,59	0,64	0,73
SNF1-like kinase /// SNF1-like kinase	NM_030751	1,65	1,04	0,96	2,12	1,84	1,44	solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; oxoglutarate carrier), member 11	NM_003562	0,51	0,84	0,93	0,55	0,64	0,82
membrane protein, palmitoylated 6 (MAGUK p55 subfamily member 6)	NM_016447	1,17	1,54	1,03	1,80	1,87	1,21	polymerase (DNA directed), epsilon 3 (p17 subunit)	BC004170	0,64	0,77	0,86	0,49	0,64	0,76
ATPase, Ca++ transporting, plasma membrane 1	L14561	1,80	2,01	0,92	2,21	1,87	1,26	TNF receptor-associated protein 1	NM_016292	0,66	0,73	1,00	0,49	0,64	0,69
annexin A1	NM_000700	4,74	1,23	1,11	2,51	1,87	0,96	radical S-adenosyl methionine domain containing 1	NM_018346	0,66	0,76	0,90	0,67	0,64	0,70
TSPY-like 4	AL050331	0,81	1,87	0,96	2,19	1,88	1,01	chromosome 6 open reading frame 48	NM_016947	0,73	0,86	0,97	0,69	0,64	0,87
cytochrome P450, family 26, subfamily B, polypeptide 1	NM_019885	2,70	3,45	1,03	1,87	1,92	1,06	solute carrier family 25 (carnitine/acylcarnitine translocase), member 20	BC001689	0,55	0,56	0,94	0,58	0,64	0,75
growth differentiation factor 15	BC000529	1,07	0,63	1,07	2,23	1,93	0,90	ribonuclease H2, large subunit	NM_006397	0,84	1,07	0,90	0,57	0,65	0,75
insulin receptor substrate 2	AF073310	1,36	1,82	1,06	2,12	1,94	1,15	CD302 antigen	NM_014880	0,80	0,70	0,80	0,49	0,65	0,67
chromosome 8 open reading frame 4	NM_020130	1,34	1,99	0,90	2,49	1,98	0,74	cyclin J	NM_019084	0,93	1,48	0,86	0,67	0,65	1,14
chromosome 9 open reading frame 3	BG036668	1,31	1,62	1,10	2,08	1,99	1,20	zinc finger, MYND domain containing 11	BE250417	1,22	1,39	0,97	0,61	0,65	1,32
signal transducer and activator of transcription 4	NM_003151	1,25	1,01	1,15	2,74	1,99	1,02	DNA (cytosine-5)-methyltransferase 3 beta	NM_006892	0,84	0,93	0,96	0,56	0,65	1,35

Die Genexpression ist als x-fache Veränderung im Vergleich zu unbehandelten Zellen angegeben



**Fortsetzung Tabelle C: Gene, durch gleichzeitige Reduktion beider Rezeptoren aber nicht durch nonsense siRNA im Vergleich zu unbehandelten Zellen signifikant und biologisch relevant reguliert**

Gen	'gene bank accession no.'	IGF-II ds1	IGF-II ds3	INSR ds1	IGF1R ds3	Rez. Mix	nonsense siRNA	Gen	'gene bank accession no.'	IGF-II ds1	IGF-II ds3	INSR ds1	IGF1R ds3	Rez. Mix	nonsense siRNA
actin, alpha 1, skeletal muscle	NM_001100	4,03	4,18	0,96	3,35	2,00	1,39	hypothetical protein FLJ21918	NM_024939	1,01	0,85	0,98	0,61	0,65	0,99
insulin-like growth factor binding protein 2, 36kDa	NM_000597	2,76	2,23	0,82	2,34	2,01	1,00	phosphoribosylaminoimidazole carboxylase, phosphoribosylaminoimidazole succinocarboxamide synthetase	AA902652	0,68	0,77	0,86	0,58	0,65	0,68
protocadherin 17	NM_014459	1,57	2,29	0,98	1,85	2,02	0,78	cytoplasmic FMR1 interacting protein 1	BC005097	0,96	0,97	0,86	0,61	0,65	1,05
defensin, alpha 5, Paneth cell-specific	NM_021010	1,38	2,07	1,02	1,88	2,03	0,94	hydroxymethylbilane synthase	NM_000190	0,86	0,87	0,90	0,60	0,65	0,83
four and a half LIM domains 2	NM_001450	4,54	2,06	1,14	2,99	2,04	1,42	phenylalanine hydroxylase	NM_000277	0,54	0,85	0,83	0,58	0,65	0,78
latent transforming growth factor beta binding protein 1	AI986120	2,26	2,33	1,17	2,14	2,06	1,16	CDC42 effector protein (Rho GTPase binding)	AL162074	0,89	0,95	0,80	0,64	0,65	0,95
platelet derived growth factor C	NM_016205	1,93	1,96	0,85	2,79	2,17	1,14	phospholysine phosphohistidine inorganic pyrophosphate phosphatase	NM_022126	0,85	0,79	0,83	0,61	0,65	0,92
amphiregulin (schwannoma-derived growth factor)	NM_001657	1,84	6,58	0,90	2,76	2,23	1,34	cytochrome c-1	NM_001916	0,45	0,72	1,01	0,54	0,65	0,85
I factor (complement)	NM_000204	0,64	0,63	0,81	3,00	2,25	0,91	FERM, RhoGEF (ARHGEF) and pleckstrin domain protein 1 (chondrocyte-derived)	BF213279	1,32	1,45	0,73	0,76	0,65	1,17
prostaglandin E receptor 4 (subtype EP4)	AI675173	1,52	4,38	0,99	2,33	2,26	1,24	selenoprotein X, 1	NM_016332	0,78	0,60	0,91	0,56	0,66	0,80
lactate dehydrogenase B	NM_002300	1,18	1,07	1,18	4,00	2,51	0,98	prohibitin 2	NM_007273	0,71	0,80	0,94	0,62	0,66	0,83
palmdelphin	NM_017734	1,42	2,86	0,98	1,97	2,57	0,70	ceramide kinase	NM_022766	1,02	1,31	0,86	0,63	0,66	1,20
chondroitin sulfate proteoglycan 2 (versican)	BF590263	4,24	4,27	0,95	3,86	2,62	1,48	3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase 1 (soluble)	NM_002130	0,72	0,77	0,91	0,53	0,66	0,80
calponin 1, basic, smooth muscle	NM_001299	3,98	2,61	1,02	5,32	2,70	1,46	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 8	NM_002812	0,87	0,80	0,91	0,69	0,66	0,71
leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 5	AF062006	2,01	2,11	1,34	3,38	2,86	1,12	complement component 3	NM_000064	0,19	0,31	0,94	0,50	0,66	0,83
folistatin	NM_013409	1,35	1,85	1,00	3,25	3,63	0,80	NAD(P)H dehydrogenase, quinone 1	AI039874	0,80	0,46	0,87	0,58	0,66	0,73
fibrinogen-like 1	NM_004467	0,75	0,69	1,15	3,78	3,80	0,80	Yip1 interacting factor homolog (S. cerevisiae)	NM_020470	0,79	0,92	0,89	0,62	0,66	0,85
								cutC copper transporter homolog (E.coli)	NM_015960	0,75	0,81	0,93	0,63	0,66	0,93
								Insulin-like growth factor 1 receptor	AI830698	1,04	1,09	0,86	0,66	0,67	0,86
								squalene epoxidase	AF098865	0,76	0,98	0,80	0,64	0,67	0,90
								acetyl-Coenzyme A acetyltransferase 1 (acetoacetyl Coenzyme A thiolase)	NM_000019	0,66	0,83	0,94	0,53	0,67	0,80

Die Genexpression ist als x-fache Veränderung im Vergleich zu unbehandelten Zellen angegeben



**Tabelle D: Gene, durch IGF-II-Reduktion aber nicht durch nonsense siRNA im Vergleich zu unbehandelten Zellen signifikant und biologisch relevant reguliert**

Gen	'gene bank accession no.'	IGF-II ds1	IGF-II ds3	INSR ds1	IGF1R ds3	Rez. Mix	nonsense siRNA	Gen	'gene bank accession no.'	IGF-II ds1	IGF-II ds3	INSR ds1	IGF1R ds3	Rez. Mix	nonsense siRNA
chromosome 12 open reading frame 22	NM_030809	1,51	1,81	0,90	1,27	1,08	1,29	complement component 3	NM_000064	0,19	0,31	0,94	0,50	0,66	0,83
tensin-like SH2 domain containing 1	NM_022748	1,51	1,84	0,95	1,58	1,48	1,46	serum amyloid A4, constitutive	NM_006512	0,25	0,17	0,81	0,55	0,80	0,70
headcase homolog (Drosophila)	NM_016217	1,51	1,55	0,96	1,81	1,52	1,27	chemokine (C-C motif) ligand 20	NM_004591	0,28	0,34	1,06	0,85	0,96	1,15
ribonuclease T2	NM_003730	1,51	1,85	0,88	0,92	0,93	1,48	complement component 5	NM_001735	0,41	0,44	0,83	0,88	0,96	0,69
dihydropyrimidinase-like 3	W72516	1,51	1,84	1,11	2,01	1,58	1,08	inter-alpha (globulin) inhibitor H2	NM_002216	0,41	0,57	0,76	0,82	0,93	0,72
prostaglandin E receptor 4 (subtype EP4)	AI675173	1,52	4,38	0,99	2,33	2,26	1,24	complement component 4 binding protein, beta	NM_000716	0,44	0,32	0,84	0,64	0,76	0,75
drebrin 1	NM_004395	1,54	1,75	0,85	1,69	1,57	0,88	hypothetical protein FLJ22390	NM_022746	0,44	0,62	0,93	0,50	0,60	0,68
NCK adaptor protein 2	BC000103	1,54	1,65	0,84	1,61	1,35	1,27	carbonic anhydrase II	M36532	0,45	0,48	0,88	0,38	0,51	0,71
galactosylceramidase (Krabbe disease)	NM_000153	1,54	1,56	1,07	1,42	1,28	1,26	fatty acid binding protein 1, liver	NM_001443	0,50	0,64	0,70	0,37	0,43	0,74
protocadherin 17	NM_014459	1,57	2,29	0,98	1,85	2,02	0,78	CGI-49 protein	NM_016002	0,51	0,64	0,85	0,64	0,72	0,77
FAT tumor suppressor homolog 4 (Drosophila)	NM_024582	1,57	1,55	1,08	1,39	1,44	1,16	alpha-2-macroglobulin	NM_000014	0,54	0,48	0,76	0,79	0,80	0,89
lupus brain antigen 1	AA035414	1,59	1,56	1,14	0,96	0,98	1,15	serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade A (alpha-1 antiproteinase, antitrypsin), member 6	NM_001756	0,54	0,49	0,75	0,86	0,87	0,72
ring finger protein 44	NM_014901	1,60	1,98	0,96	2,05	1,73	1,27	annexin A9	AF230929	0,54	0,63	0,85	0,63	0,75	0,70
dickkopf homolog 1 (Xenopus laevis)	NM_012242	1,61	2,19	1,33	1,74	1,73	1,17	gap junction protein, beta 1, 32kDa (connexin 32, Charcot-Marie-Tooth neuropathy, X-linked)	NM_000166	0,54	0,53	0,91	0,70	0,85	1,04
hypothetical protein FLJ20366	NM_017786	1,67	1,70	1,00	1,49	1,34	1,32	solute carrier family 25 (carnitine/acylcarnitine translocase), member 20	BC001689	0,55	0,56	0,94	0,58	0,64	0,75
formin binding protein 1-like	AW270932	1,67	1,83	0,82	1,85	1,46	1,19	WD repeat domain 6	NM_018031	0,55	1,56	0,92	0,99	1,00	1,15
bone morphogenetic protein 4	D30751	1,67	1,55	0,94	1,18	1,16	1,14	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), beta	AL564683	0,55	0,60	0,83	0,96	0,83	0,68
glutathione S-transferase M3 (brain)	AL527430	1,68	1,67	0,84	1,37	1,33	1,39	scavenger receptor class B, member 1	NM_005505	0,55	0,59	0,92	0,49	0,63	0,89
synuclein, alpha interacting protein (synphilin)	NM_005460	1,68	2,65	0,96	1,33	1,16	1,00	hypothetical protein FLJ11286	NM_018381	0,56	0,61	0,86	0,70	0,78	0,93
special AT-rich sequence binding protein 1 (binds to nuclear matrix/scaffold-associating DNA's)	NM_002971	1,71	2,66	0,99	1,40	1,30	0,89	NAD(P)H dehydrogenase, quinone 2	NM_000904	0,57	0,53	0,92	0,42	0,48	0,78
kinesin family member 3C	AF035621	1,73	1,72	1,06	1,61	1,34	1,15	peroxisomal membrane protein 2, 22kDa	NM_018663	0,57	0,60	0,85	0,74	0,75	0,78
Microtubule-associated protein 1B	AL523076	1,74	2,59	1,09	1,93	1,37	0,98	nuclear protein E3-3	BC002873	0,58	0,59	0,97	0,50	0,61	0,72
CK2 interacting protein 1; HQ0024c protein	NM_016274	1,77	2,18	0,88	1,95	1,50	1,30	ATPase, Ca++ transporting, plasma membrane 2	R52647	0,58	0,58	0,88	0,64	0,87	0,75
testis derived transcript (3 LIM domains)	NM_015641	1,80	1,59	0,84	1,87	1,29	1,04	apolipoprotein M	NM_019101	0,59	0,44	0,89	0,75	0,89	0,69
ATPase, Ca++ transporting, plasma membrane 1	L14561	1,80	2,01	0,92	2,21	1,87	1,26	sulfotransferase family, cytosolic, 2A, dehydroepiandrosterone (DHEA)-preferring, member 1	NM_003167	0,59	0,46	1,15	0,70	0,91	1,03
transforming growth factor, beta 2	M19154	1,81	1,58	1,10	2,22	1,57	1,04	transferrin	NM_001063	0,60	0,61	0,90	0,62	0,69	0,92
KIAA0882 protein	AI348094	1,82	1,60	1,01	1,39	1,36	1,21	SH3 domain and tetratricopeptide repeats 1	NM_018986	0,61	0,59	0,84	0,78	0,86	0,96
amphiregulin (schwannoma-derived growth factor)	NM_001657	1,84	6,58	0,90	2,76	2,23	1,34	growth and transformation-dependent protein	NM_014367	0,62	0,58	1,03	0,72	0,88	1,02
vimentin	AI922599	1,85	2,02	0,80	1,22	1,18	1,42	asialoglycoprotein receptor 2	NM_001181	0,62	0,66	0,77	0,69	0,75	0,78
coagulation factor II (thrombin) receptor	NM_001992	1,85	1,50	0,92	1,23	1,12	1,17	glutamate dehydrogenase 1	AI339331	0,63	0,63	0,82	0,52	0,73	1,11
Rho-related BTB domain containing 1	AB018283	1,86	1,85	0,94	1,65	1,26	0,98	nuclear receptor subfamily 0, group B, member 2	NM_021969	0,63	0,63	0,84	1,07	1,01	0,82
Rho family GTPase 3	BG054844	1,88	1,57	1,04	1,88	1,84	1,07	dopa decarboxylase (aromatic L-amino acid decarboxylase)	NM_000790	0,63	0,36	1,10	0,69	0,83	1,22
leprecan-like 1	NM_018192	1,89	2,48	0,86	0,92	1,15	0,99	NFS1 nitrogen fixation 1 (S. cerevisiae)	NM_021100	0,63	0,53	0,94	0,60	0,68	0,68
family with sequence similarity 46, member A	AW246673	1,91	2,25	0,95	1,59	1,44	1,22	solute carrier family 35 (UDP-glucuronic acid/UDP-N-acetylgalactosamine dual transporter), member D1	N80922	0,63	0,67	0,79	0,73	0,82	0,97
myosin, heavy polypeptide 9, non-muscle	AI827941	1,91	1,59	0,87	1,68	1,45	1,30	A kinase (PRKA) anchor protein 2 /// PALM2-AKAP2 protein	NM_007203	0,64	0,64	0,80	0,61	0,68	0,70
cadherin 6, type 2, K-cadherin (fetal kidney)	NM_004932	1,93	2,12	1,09	1,75	1,54	1,46	I factor (complement)	NM_000204	0,64	0,63	0,81	3,00	2,25	0,91
platelet derived growth factor C	NM_016205	1,93	1,96	0,85	2,79	2,17	1,14	plasminogen	M74220	0,64	0,59	0,86	0,78	0,98	0,80
downregulated in ovarian cancer 1	NM_014890	1,95	2,09	0,86	2,97	1,81	1,16	cytochrome b-5	NM_001914	0,66	0,51	0,79	0,75	0,93	0,84
BTB and CNC homology 1, basic leucine zipper transcription factor 2	AK027193	1,96	1,67	0,99	2,46	1,76	1,20								
RNA binding motif, single stranded interacting protein 1	NM_016839	1,99	1,59	0,84	1,65	1,47	1,42								
calponin 2	NM_004368	1,99	1,70	0,96	1,61	1,34	1,21								
leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 5	AF062006	2,01	2,11	1,34	3,38	2,86	1,12								

Die Genexpression ist als x-fache Veränderung im Vergleich zu unbehandelten Zellen angegeben



**Fortsetzung Tabelle D: Gene, durch IGF-II-Reduktion aber nicht durch nonsense siRNA im Vergleich zu unbehandelten Zellen signifikant und biologisch relevant reguliert**

Gen	'gene bank accession no.'	IGF-II ds1	IGF-II ds3	INSR ds1	IGF1R ds3	Rez. Mix	nonsense siRNA	Gen	'gene bank accession no.'	IGF-II ds1	IGF-II ds3	INSR ds1	IGF1R ds3	Rez. Mix	nonsense siRNA
tumor necrosis factor, alpha-induced protein 8	NM_014350	2,02	1,99	0,95	1,14	1,12	1,36	limitrin	AW888223	2,46	1,88	0,92	1,78	1,49	1,22
fibronectin leucine rich transmembrane protein 3	NM_013281	2,02	2,15	0,81	2,39	1,48	1,37	cytochrome P450, family 26, subfamily B, polypeptide 1	NM_019885	2,70	3,45	1,03	1,87	1,92	1,06
polo-like kinase 2 (Drosophila)	NM_006622	2,04	1,54	1,04	1,70	1,28	0,91	dickkopf homolog 3 (Xenopus laevis)	NM_013253	2,75	1,62	0,90	0,99	0,89	1,47
dihydropyrimidinase-like 2	NM_001386	2,05	2,12	0,85	1,94	1,67	1,20	insulin-like growth factor binding protein 2, 36kDa	NM_000597	2,76	2,23	0,82	2,34	2,01	1,00
EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1	AI826799	2,10	2,43	1,07	0,87	0,99	1,02	keratin 19	NM_002276	2,88	1,77	1,25	1,65	1,44	1,00
Desmoglein 2	NM_001943	2,12	1,66	0,93	1,62	1,42	1,43	tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (erythroid potentiating activity, collagenase inhibitor)	NM_003254	2,89	1,67	1,03	1,75	1,45	1,40
proprotein convertase subtilisin/kexin type 5	NM_006200	2,15	1,52	0,88	1,30	1,02	1,24	cysteine-rich, angiogenic inducer, 61	NM_001554	3,67	1,88	1,09	2,21	1,82	1,11
immunoglobulin superfamily, member 4	NM_014333	2,16	2,43	0,95	1,41	1,12	1,29	calponin 1, basic, smooth muscle	NM_001299	3,98	2,61	1,02	5,32	2,70	1,46
microtubule associated monooxygenase, calponin and LIM domain containing 1	NM_022765	2,17	1,71	1,05	1,69	1,24	1,20	actin, alpha 1, skeletal muscle	NM_001100	4,03	4,18	0,96	3,35	2,00	1,39
ADP-ribosylation factor-like 7	AW450363	2,19	3,02	1,08	1,16	1,13	1,21	chondroitin sulfate proteoglycan 2 (versican)	BF590263	4,24	4,27	0,95	3,86	2,62	1,48
latent transforming growth factor beta binding protein 1	AI986120	2,26	2,33	1,17	2,14	2,06	1,16	four and a half LIM domains 2	NM_001450	4,54	2,06	1,14	2,99	2,04	1,42
collagen, type I, alpha 1	K01228	2,34	1,77	1,13	1,52	1,45	1,22	A kinase (PRKA) anchor protein (gravin) 12	AB003476	5,16	2,71	0,94	2,67	1,64	1,43



**Tabelle E: Gene, durch nonsense siRNA im Vergleich zu unbehandelten Zellen signifikant und biologisch relevant reguliert**

Gen	'gene bank accession no.'	IGF-II ds1	IGF-II ds3	INSR ds1	IGF1R ds3	Rez. Mix	nonsense siRNA	Gen	'gene bank accession no.'	IGF-II ds1	IGF-II ds3	INSR ds1	IGF1R ds3	Rez. Mix	nonsense siRNA
epoxide hydrolase 1, microsomal (xenobiotic)	NM_000120	1,12	1,09	0,82	1,02	1,01	1,50	orosomucoid 1	NM_000607	0,27	0,27	0,81	0,55	0,66	0,23
lysosomal-associated protein transmembrane 4 alpha	NM_014713	1,40	0,90	0,84	1,44	1,36	1,50	histone 1, H1c	BC002649	0,52	1,28	0,72	1,00	0,82	0,30
heparanase	AF155510	1,47	1,22	1,05	1,09	1,11	1,50	alpha-2-HS-glycoprotein	NM_001622	0,26	0,37	0,89	0,92	1,13	0,31
KIAA0802	AB018345	1,26	2,00	0,87	1,37	1,01	1,50	acyl-Coenzyme A oxidase 2, branched chain	NM_003500	0,35	0,19	0,97	0,36	0,48	0,32
laminin, alpha 3	NM_000227	1,31	1,25	1,05	1,10	1,02	1,50	delta-like 1 homolog (Drosophila)	U15979	0,36	0,35	0,73	0,44	0,57	0,33
calcium channel, voltage-dependent, beta 3 subunit	U07139	2,08	1,85	1,05	2,04	1,39	1,50	keratin 23 (histone deacetylase inducible)	NM_015515	0,27	0,55	0,73	0,33	0,45	0,35
N-myc (and STAT) interactor	NM_004688	0,97	0,95	0,99	0,73	0,73	1,50	histone 1, H2bd	BC002842	0,74	2,10	0,83	1,63	1,39	0,36
chromosome 1 open reading frame 9	NM_016227	1,76	1,53	0,89	1,43	1,37	1,50	S100 calcium binding protein P	NM_005980	0,34	0,14	0,83	0,41	0,51	0,36
tetraspanin 12	NM_012338	1,61	2,27	0,92	1,76	1,66	1,51	peroxiredoxin 4	NM_006406	0,81	1,08	0,93	0,94	0,96	0,40
B-cell CLL/lymphoma 3	AI829875	0,93	0,89	0,88	1,14	1,04	1,51	glutamate-ammonia ligase (glutamine synthase) domain containing 1	NM_016571	1,75	0,80	0,78	0,50	0,57	0,41
KIAA0143 protein	AW470003	1,24	1,03	0,95	0,74	0,86	1,51	neurotensin	NM_006183	0,85	1,34	0,96	0,93	1,28	0,41
serine/threonine kinase 17a (apoptosis-inducing)	NM_004760	1,28	1,31	1,07	1,32	1,28	1,51	regulator of G-protein signalling 2, 24kDa	NM_002923	0,67	1,06	1,04	0,74	0,72	0,42
activin A receptor, type I	L02911	1,27	1,49	0,82	1,91	1,46	1,51	dual specificity phosphatase 5	U16996	0,90	0,84	0,71	1,03	0,97	0,43
apolipoprotein E	NM_000041	0,68	0,89	0,91	1,24	1,21	1,51	processing of precursor 5, ribonuclease P/MRP subunit (S. cerevisiae)	NM_015918	0,80	0,60	0,98	0,71	0,74	0,46
wingless-type MMTV integration site family, member 11	NM_004626	1,11	1,07	1,10	1,16	1,04	1,52	hypothetical protein MGC2963 /// hypothetical protein MGC2963	NM_031298	0,85	0,83	0,92	1,00	0,98	0,47
atractin	AF106861	1,04	1,04	0,98	0,97	1,06	1,52	monoglyceride lipase /// monoglyceride lipase	BC006230	0,33	0,91	0,68	0,40	0,52	0,47
IBR domain containing 3	AL031602	1,29	1,09	1,02	1,38	1,24	1,52	pirin (iron-binding nuclear protein)	NM_003662	0,71	0,65	0,75	0,45	0,47	0,49
PH domain and leucine rich repeat protein phosphatase-like	AB023148	1,35	1,31	1,13	1,16	1,15	1,52	secreted phosphoprotein 1 (osteopontin, bone sialoprotein I, early T-lymphocyte activation 1)	M83248	2,73	2,88	1,58	0,94	1,09	0,49
chromosome 7 open reading frame 32	AI884867	0,74	1,43	0,85	1,10	0,97	1,52	glucosidase, alpha; neutral AB	W87689	0,90	1,08	0,89	0,72	0,83	0,49
gelsolin (amyloidosis, Finnish type)	NM_000177	1,19	0,85	0,99	0,77	0,81	1,52	nucleolar and coiled-body phosphoprotein 1	NM_004741	0,80	0,82	1,09	0,93	0,96	0,49
yippe-like 5 (Drosophila)	NM_016061	1,65	1,54	0,88	1,15	1,10	1,52	apolipoprotein H (beta-2-glycoprotein I)	NM_000042	0,54	0,75	0,99	1,03	1,31	0,50
ring finger protein 103	NM_005667	1,26	1,04	1,01	1,34	1,33	1,53	timeless-interacting protein	NM_017858	0,58	0,75	1,06	0,53	0,66	0,50

Die Genexpression ist als x-fache Veränderung im Vergleich zu unbehandelten Zellen angegeben



## Fortsetzung Tabelle E: Gene, durch nonsense siRNA im Vergleich zu unbehandelten Zellen signifikant und biologisch relevant reguliert

Gen	'gene bank accession no.'	IGF-II ds1	IGF-II ds3	INSR ds1	IGF1R ds3	Rez. Mix	nonsense siRNA	Gen	'gene bank accession no.'	IGF-II ds1	IGF-II ds3	INSR ds1	IGF1R ds3	Rez. Mix	nonsense siRNA
v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog B (avian)	NM_005461	0,99	1,09	1,08	1,26	1,24	1,53	asialoglycoprotein receptor 1	NM_001671	0,43	0,44	0,87	0,41	0,57	0,50
retinol binding protein 1, cellular	NM_002899	1,38	2,04	1,01	1,26	1,17	1,53	phosphatidylinositol-specific phospholipase C, X domain containing 1	NM_018390	0,79	0,74	0,97	0,65	0,71	0,50
BTG family, member 3	NM_006806	1,16	1,04	0,82	0,44	0,42	1,53	lumican	NM_002345	3,92	3,55	1,18	1,00	1,35	0,51
glycerophosphodiester phosphodiesterase domain containing 5	AL041124	1,09	1,03	1,07	1,04	1,02	1,53	insulin induced gene 1	BE300521	0,59	0,54	0,73	0,46	0,46	0,51
cysteine and glycine-rich protein 1	NM_004078	1,72	1,45	0,87	2,05	1,64	1,54	arginase, liver	NM_000045	0,54	0,50	0,73	0,52	0,61	0,51
receptor (calcitonin) activity modifying protein 1	NM_005855	1,05	1,09	1,07	0,99	1,07	1,54	FK506 binding protein 3, 25kDa	M90820	1,03	1,04	0,86	0,89	0,89	0,51
solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 6	NM_017585	0,88	0,94	0,83	1,18	1,02	1,54	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, ATPase, 3	AL545523	0,70	0,82	1,02	0,57	0,65	0,51
major histocompatibility complex, class I, F	NM_018950	0,96	1,01	1,14	1,05	1,08	1,54	FK506 binding protein 11, 19 kDa	NM_016594	0,61	0,49	1,07	0,36	0,49	0,52
synaptophysin-like protein	AI768845	1,11	1,11	0,98	1,03	1,07	1,54	transthyretin (prealbumin, amyloidosis type I)	AF162690	0,64	0,86	1,05	1,05	1,35	0,52
intercellular adhesion molecule 1 (CD54), human rhinovirus receptor	AI608725	0,97	0,78	1,09	1,70	1,43	1,54	paternally expressed 10	BE858180	0,74	0,79	0,84	0,71	0,89	0,52
protein kinase (cAMP-dependent, catalytic) inhibitor gamma	NM_007066	0,67	1,52	0,94	1,56	1,41	1,55	thrombospondin 4	NM_003248	0,63	0,73	0,70	0,52	0,52	0,52
proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type, 8 (large multifunctional protease 7)	U17496	1,11	1,06	1,10	1,00	1,02	1,55	general transcription factor IIIA	NM_002097	0,80	0,97	0,92	1,02	0,95	0,53
coagulation factor X	NM_000504	0,96	1,12	1,02	0,91	0,96	1,55	lectin, galactoside-binding, soluble, 3 (galectin 3) /// galectin-3 internal gene	BC001120	0,48	0,43	0,82	0,40	0,47	0,53
SERTA domain containing 2	BG107456	1,23	1,34	0,85	1,53	1,28	1,55	ribonucleotide reductase M2 polypeptide	BE966236	0,70	0,76	0,93	0,42	0,61	0,53
lectin, galactoside-binding, soluble, 2 (galectin 2) /// lectin, galactoside-binding, soluble, 2 (galectin 2)	NM_006498	1,14	0,81	1,04	1,10	1,01	1,56	stearoyl-CoA desaturase (delta-9-desaturase)	AA678241	0,45	0,46	0,75	0,49	0,60	0,53
coagulation factor II (thrombin) receptor-like 1	NM_005242	2,94	1,29	1,08	1,35	1,03	1,56	RAD23 homolog A (S. cerevisiae)	NM_005053	0,81	0,72	0,90	0,58	0,67	0,54
phospholipid scramblase 3 /// hypothetical protein MGC40107	NM_020360	1,48	1,61	0,98	1,54	1,29	1,56	tribbles homolog 3 (Drosophila)	NM_021158	0,56	0,56	0,92	0,73	0,68	0,54
mannosidase, beta A, lysosomal	NM_005908	1,19	1,40	0,95	1,36	1,11	1,56	SHC (Src homology 2 domain containing) transforming protein 1	AI809967	0,88	0,65	0,86	0,75	0,73	0,54
Kruppel-like factor 11	AA149594	1,39	1,31	1,00	1,77	1,35	1,56	absent in melanoma 1	U83115	0,47	0,54	0,78	0,66	0,78	0,54
pleckstrin homology, Sec7 and coiled-coil domains 2 (cytohesin-2)	BC004361	1,74	1,73	0,85	1,91	1,58	1,56	stromal cell-derived factor 2-like 1	NM_022044	0,48	0,56	0,89	0,56	0,64	0,54
capping protein (actin filament), gelsolin-like	NM_001747	1,61	1,28	0,87	1,35	1,07	1,56	peroxisomal trans-2-enoyl-CoA reductase	NM_018441	0,46	0,43	0,86	0,51	0,71	0,54
frizzled homolog 4 (Drosophila)	NM_012193	1,22	1,43	1,07	2,38	2,30	1,57	selenophosphate synthetase 2	NM_012248	0,68	0,98	0,91	0,68	0,75	0,54
carboxypeptidase A2 (pancreatic)	NM_001869	1,06	0,98	1,11	1,07	1,00	1,57	FK506 binding protein 14, 22 kDa	NM_017946	0,71	0,75	0,72	0,53	0,54	0,55
ADP-ribosylation factor-like 2 binding protein	NM_012106	1,36	1,20	0,94	0,91	0,98	1,57	tetraspanin 8	NM_004616	0,97	0,51	1,63	1,34	1,45	0,55
hepatocellular carcinoma-associated antigen 112	NM_018487	0,53	0,83	0,61	0,29	0,34	1,57	mitochondrial tumor suppressor 1	AI695017	0,41	0,62	0,78	0,72	0,71	0,55
fer-1-like 3, myoferlin (C. elegans)	NM_013451	2,90	1,75	1,19	1,74	1,47	1,57	ZW10 homolog, centromere/kinetochore protein (Drosophila)	NM_004724	0,73	0,96	0,93	0,90	0,88	0,55
solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system), member 7	NM_003982	1,49	1,37	1,17	1,47	1,35	1,58	hypothetical protein MGC2574	NM_024098	0,60	0,59	0,90	0,74	0,91	0,55
genethonin 1	NM_003943	1,69	1,39	0,93	1,08	1,11	1,58	hepatic leukemia factor	AI810712	0,51	0,58	0,87	0,68	0,80	0,55
N-myc downstream regulated gene 1	NM_006096	0,89	1,26	0,89	1,27	1,29	1,58	myxovirus (influenza virus) resistance 2 (mouse)	NM_002463	0,69	0,90	0,89	0,74	0,74	0,56
UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 1 (GalNAc-T1)	NM_020474	1,20	1,63	0,87	0,68	0,86	1,58	bicaudal D homolog 2 (Drosophila)	BC002327	0,98	1,07	0,76	1,06	0,95	0,56
rho/rac guanine nucleotide exchange factor (GEF) 18	AB011093	1,49	1,39	0,96	1,71	1,46	1,58	apolipoprotein B (including Ag(x) antigen)	NM_000384	0,40	0,47	0,89	0,72	0,84	0,56
protease, serine, 23	NM_007173	3,45	3,33	0,76	1,93	1,77	1,58	adaptor-related protein complex 1, mu 2 subunit	NM_005498	0,67	0,44	0,87	0,63	0,64	0,56
serine protease inhibitor, Kazal type 1	NM_003122	1,15	1,74	0,88	1,43	1,46	1,58	high mobility group AT-hook 2 /// high mobility group AT-hook 2	NM_003483	0,71	0,98	0,78	0,67	0,74	0,56
serum/glucocorticoid regulated kinase	NM_005627	1,41	3,29	0,83	2,23	1,71	1,58	angiotensinogen (serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade A (alpha-1 antiproteinase, antitrypsin), member 8)	NM_000029	0,51	0,46	0,71	0,81	0,83	0,56
oxytocin, prepro- (neurophysin I)	NM_000915	1,04	0,98	1,17	1,13	1,21	1,59	peptidylprolyl isomerase B (cyclophilin B)	NM_000942	0,67	0,89	0,90	0,81	0,94	0,56
tubulin, beta 3	NM_006086	2,77	2,98	0,98	2,69	1,81	1,59	protease, serine, 15	U02389	0,68	0,91	0,95	0,66	0,71	0,56
zinc finger protein 364	AL530462	1,21	1,02	0,93	0,98	0,99	1,59	transmembrane 4 L six family member 5	NM_003963	0,88	0,50	0,96	0,56	0,74	0,56
proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type, 9 (large multifunctional protease 2)	NM_002800	1,06	1,00	1,17	1,05	1,01	1,59	zinc finger protein 271	AF159567	0,80	0,93	0,92	1,06	1,01	0,57
cathepsin H	NM_004390	2,00	0,93	0,95	1,00	1,00	1,59	v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)	NM_002467	0,66	0,76	1,06	1,43	1,24	0,57
bone morphogenetic protein 2	AA583044	1,12	1,60	0,85	1,48	1,54	1,60	Malic enzyme 1, NADP(+)-dependent, cytosolic	AL049699	1,07	0,72	0,85	0,87	0,85	0,57

Die Genexpression ist als x-fache Veränderung im Vergleich zu unbehandelten Zellen angegeben





# Fortsetzung Tabelle E: Gene, durch nonsense siRNA im Vergleich zu unbehandelten Zellen signifikant und biologisch relevant reguliert

Gen	'gene bank accession no.'	IGF-II ds1	IGF-II ds3	INSR ds1	IGF1R ds3	Rez. Mix	nonsense siRNA	Gen	'gene bank accession no.'	IGF-II ds1	IGF-II ds3	INSR ds1	IGF1R ds3	Rez. Mix	nonsense siRNA
procollagen-proline, 2-oxoglutarate 4-dioxygenase (proline 4-hydroxylase), alpha polypeptide II	NM_004199	1,35	1,43	0,89	1,21	1,13	1,60	lysozyme (renal amyloidosis) /// leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily B (with TM and ITIM domains), member 1	AV711904	1,39	0,87	0,69	1,73	1,59	0,57
sarcoglycan, beta (43kDa dystrophin-associated glycoprotein)	U29586	1,92	1,65	0,99	1,62	1,35	1,60	cathepsin C	NM_001814	0,85	1,11	0,93	0,98	0,96	0,57
trinucleotide repeat containing 9	AK027006	1,54	1,58	0,97	1,63	1,34	1,60	Retinol binding protein 4, plasma	AA908769	0,49	0,58	0,92	0,70	0,92	0,57
mitogen-activated protein kinase kinase kinase 8	NM_005204	1,04	1,23	0,95	1,50	1,19	1,60	tropomyosin 2 (beta)	NM_003289	1,38	0,97	0,83	1,46	1,24	0,57
homeo box A1	S79910	1,42	1,16	0,98	1,44	1,28	1,61	stratifin	BC000329	0,80	0,79	0,84	0,43	0,45	0,57
small membrane protein 1	NM_014313	1,32	1,18	0,93	1,61	1,36	1,61	hypothetical protein HSPC111	NM_016391	0,70	0,68	1,00	0,97	1,00	0,57
carbohydrate (chondroitin 6) sulfotransferase 3	NM_004273	1,08	1,54	1,01	1,05	1,13	1,61	anterior gradient 2 homolog (Xenopus laevis)	AF088867	1,12	0,67	0,94	1,09	1,08	0,57
signal-transducing adaptor protein-2	BC000795	1,07	1,02	1,03	1,09	1,04	1,62	TBC1 domain family, member 4	AI650848	0,84	0,79	0,92	0,89	0,95	0,57
ras homolog gene family, member D	BC001338	1,38	1,12	0,92	1,31	1,28	1,62	angiotensin II receptor, type 1	NM_000685	0,89	1,00	0,93	0,94	0,94	0,58
TGFB-induced factor (TALE family homeobox)	NM_003244	1,60	1,27	0,88	1,70	1,38	1,62	CDC45 cell division cycle 45-like (S. cerevisiae)	NM_003504	0,71	0,98	0,99	0,44	0,56	0,58
coagulation factor III (thromboplastin, tissue factor)	NM_001993	1,93	1,99	0,99	1,52	1,23	1,62	nestin	NM_024609	1,19	0,69	0,88	0,70	0,66	0,58
CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), delta	M83667	1,39	1,48	0,88	2,59	2,15	1,63	baculoviral IAP repeat-containing 5 (survivin)	AA648913	0,73	0,98	0,93	0,83	0,97	0,58
stannin	AF070673	1,38	1,35	1,00	1,51	1,25	1,63	argininosuccinate lyase	NM_000048	0,71	0,59	0,96	0,46	0,56	0,58
likely ortholog of chicken tsukushi	NM_015516	0,82	1,03	0,87	1,25	1,18	1,63	tubulin, alpha 1 (testis specific)	AL565074	0,63	0,80	0,87	0,54	0,62	0,58
apolipoprotein C-I	NM_001645	1,12	0,83	0,99	0,81	0,97	1,63	Ras-GTPase activating protein SH3 domain-binding protein 2	NM_012297	1,04	1,00	0,96	1,12	1,16	0,58
DIP13 beta	NM_018171	1,52	1,46	0,95	1,27	1,15	1,63	lysyl oxidase	NM_002317	0,73	0,83	0,92	0,69	0,77	0,59
tudor domain containing 7	AW129593	1,43	1,10	1,04	1,20	1,17	1,63	branched chain aminotransferase 1, cytosolic	AI652662	1,11	0,99	1,10	1,16	1,18	0,59
cysteine and glycine-rich protein 2	NM_001321	1,97	2,62	0,84	1,31	1,14	1,63	density-regulated protein	AB014731	0,76	0,98	1,06	1,05	1,17	0,59
jun B proto-oncogene	NM_002229	1,71	1,99	0,88	2,69	2,12	1,63	tumor rejection antigen (gp96) 1	AI582238	0,63	0,98	0,88	0,68	0,75	0,59
interferon regulatory factor 1	NM_002198	1,14	1,00	0,95	1,25	1,18	1,63	centromere protein E, 312kDa	NM_001813	0,79	1,64	1,00	0,67	0,97	0,60
unc-119 homolog (C. elegans)	NM_005148	0,98	1,07	1,01	1,07	1,09	1,64	nuclear receptor subfamily 1, group H, member 4	NM_005123	0,45	0,73	0,80	0,66	0,81	0,60
endothelin receptor type B	NM_000115	1,23	1,09	1,00	1,50	1,36	1,64	caspase 7, apoptosis-related cysteine protease	NM_001227	1,67	1,09	0,82	0,68	0,75	0,60
biliverdin reductase A	AA740186	0,97	1,64	0,91	0,89	0,91	1,64	transmembrane 4 L six family member 4	BC001386	0,59	3,27	0,69	1,56	1,59	0,60
brain expressed X-linked-like 1	AL523320	0,87	1,43	0,90	1,37	1,13	1,65	Down syndrome critical region gene 2	NM_003720	0,65	0,62	0,87	0,53	0,60	0,60
hyaluronan binding protein 2	NM_004132	0,53	2,20	0,61	1,05	0,92	1,65	IMP (inosine monophosphate) dehydrogenase 2	NM_000884	0,71	0,72	0,99	0,57	0,62	0,60
histone deacetylase 9	NM_014707	1,46	1,53	1,12	2,73	1,81	1,65	hypothetical protein A-211C6.1	BE963444	0,66	0,78	0,80	0,76	0,71	0,60
p21/Cdc42/Rac1-activated kinase 1 (STE20 homolog, yeast)	U51120	1,10	1,36	1,05	1,55	1,33	1,65	MCM3 minichromosome maintenance deficient 3 (S. cerevisiae)	NM_002388	0,64	1,06	0,93	0,56	0,76	0,60
ubiquitin-conjugating enzyme E2L 6	NM_004223	0,96	1,20	0,94	0,94	0,93	1,65	melanoma antigen family B, 2	NM_002364	0,79	1,82	0,91	2,14	1,69	0,60
dual specificity phosphatase 4	NM_001394	1,71	2,55	0,89	2,20	1,65	1,65	solute carrier family 29 (nucleoside transporters), member 2	AF034102	0,75	0,61	0,80	0,48	0,53	0,60
asparaginase like 1	NM_025080	0,91	1,24	0,92	0,89	0,85	1,65	cAMP responsive element binding protein 3-like 2	BE675139	0,95	0,78	0,85	0,72	0,84	0,61
B-cell translocation gene 1, anti-proliferative	AL535380	1,02	1,47	0,80	1,94	2,15	1,66	acyl-CoA synthetase long-chain family member 4	NM_022977	0,54	0,56	0,70	0,51	0,62	0,61
peptidylprolyl isomerase C (cyclophilin C)	BE962749	1,15	1,44	0,63	1,26	0,97	1,66	splicing factor 3b, subunit 5, 10kDa /// splicing factor 3b, subunit 5, 10kDa	NM_031287	0,76	0,76	0,98	1,12	1,09	0,61
fibulin 5	NM_006329	0,75	0,85	0,88	1,01	0,99	1,66	immunoglobulin superfamily, member 1	NM_001555	0,58	0,40	0,97	0,91	1,11	0,61
v-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog B, nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 3 (avian)	NM_006509	1,20	0,94	1,05	1,47	1,29	1,66	serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade E (nexin, plasminogen activator inhibitor type 1), member 1	AL574210	1,26	0,56	1,05	0,96	0,77	0,61
MHC class I polypeptide-related sequence B	NM_005931	1,03	0,89	0,74	0,69	0,66	1,67	NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 2, 49kDa (NADH-coenzyme Q reductase)	NM_004550	0,79	0,86	0,91	0,74	0,79	0,61
F-box protein 34	NM_017943	1,42	1,88	0,91	1,41	1,29	1,67	PRP19/PSO4 pre-mRNA processing factor 19 homolog (S. cerevisiae)	NM_014502	0,66	0,77	0,92	0,70	0,82	0,61
UDP-Gal:betaGlcNAc beta 1,4-galactosyltransferase, polypeptide 5	AB004550	1,38	1,33	1,00	1,69	1,48	1,68	heat shock 70kDa protein 9B (mortalin-2)	AA927701	0,67	0,66	0,94	0,76	0,82	0,61
cathepsin L2	AF070448	1,32	1,55	0,97	1,04	0,95	1,68	polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide D	NM_004805	0,92	0,97	0,95	0,99	1,01	0,61
adipose differentiation-related protein	BC005127	1,13	1,24	1,14	1,19	1,24	1,69	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 11b (osteoprotegerin)	BF433902	1,59	1,09	1,13	0,82	0,86	0,61
SMAD, mothers against DPP homolog 7 (Drosophila)	NM_005904	1,36	1,20	0,84	1,81	1,60	1,69	AHA1, activator of heat shock 90kDa protein ATPase homolog 1 (yeast)	NM_012111	0,86	0,77	1,09	0,97	1,01	0,61
filamin B, beta (actin binding protein 278)	AV712733	1,95	1,29	1,03	1,63	1,44	1,69	phosphatase and actin regulator 2	NM_014721	1,01	1,00	0,86	0,81	0,90	0,61

Die Genexpression ist als x-fache Veränderung im Vergleich zu unbehandelten Zellen angegeben





# Fortsetzung Tabelle E: Gene, durch nonsense siRNA im Vergleich zu unbehandelten Zellen signifikant und biologisch relevant reguliert

Gen	'gene bank accession no.'	IGF-II ds1	IGF-II ds3	INSR ds1	IGF1R ds3	Rez. Mix	nonsense siRNA	Gen	'gene bank accession no.'	IGF-II ds1	IGF-II ds3	INSR ds1	IGF1R ds3	Rez. Mix	nonsense siRNA
cysteine-rich motor neuron 1	BG546884	2,51	1,48	1,01	1,71	1,69	1,69	dimethylarginine dimethylaminohydrolase 1	AL078459	1,23	0,78	0,86	0,78	0,94	0,62
CDP-diacylglycerol synthase (phosphatidate cytidyltransferase) 1	U65887	0,71	0,56	0,93	0,81	0,92	1,69	molybdenum cofactor sulfurase	NM_017947	0,67	0,62	1,05	0,51	0,56	0,62
cordon-bleu homolog (mouse)	AA594937	1,33	0,81	0,99	1,14	1,07	1,69	aldolase A, fructose-bisphosphate	NM_000034	0,79	0,79	1,00	0,63	0,70	0,62
GATA binding protein 6	D87811	1,69	1,73	0,79	1,43	1,24	1,69	ALL1-fused gene from chromosome 1q /// ALL1-fused gene from chromosome 1q acyl-Coenzyme A dehydrogenase, very long chain	BC006471	2,01	1,71	0,93	1,50	1,14	0,62
tropomodulin 1	NM_003275	1,12	1,38	1,04	1,34	1,21	1,69	NDRG family member 4	NM_000018	0,85	0,66	1,01	0,36	0,45	0,62
laminin, alpha 5	BC003355	1,65	1,48	0,99	1,36	1,46	1,70	X-box binding protein 1	AV724216	2,38	1,50	0,69	1,00	0,98	0,62
kinesin family member 5C	BF059313	1,20	1,87	1,01	1,48	1,40	1,70	histone 1, H4h	NM_005080	0,73	0,67	0,81	0,74	0,78	0,62
rhomboid family 1 (Drosophila)	NM_022450	1,36	1,21	1,02	1,46	1,29	1,70	histone deacetylase 1	NM_003543	0,72	1,09	0,95	1,07	0,94	0,63
WEE1 homolog (S. pombe)	X62048	1,41	1,18	1,03	1,92	1,64	1,72	WW domain binding protein 11	NM_004964	1,02	0,95	0,90	0,90	0,92	0,63
creatine kinase, brain	NM_001823	0,83	1,25	0,91	1,16	1,17	1,73	signal sequence receptor, gamma (translocon- associated protein gamma)	NM_016312	0,90	0,99	0,90	0,87	0,94	0,63
baculoviral IAP repeat-containing 3	U37546	1,21	0,92	1,08	1,30	1,12	1,73	spermidine synthase	NM_007107	0,69	0,69	0,89	0,68	0,77	0,63
G protein-coupled receptor, family C, group 5, member B	NM_016235	2,00	1,41	1,13	1,20	1,16	1,73	gap junction protein, alpha 1, 43kDa (connexin 43)	NM_000165	0,67	0,66	1,02	0,68	0,80	0,63
nidogen 2 (osteonidogen)	NM_007361	2,87	1,26	1,02	0,72	0,74	1,74	Acyl-CoA synthetase long-chain family member 3	NM_000165	2,58	0,74	0,85	2,36	1,48	0,63
frizzled homolog 7 (Drosophila)	AI333651	1,04	1,29	0,78	1,14	1,00	1,74	c-src tyrosine kinase	AL525798	0,49	0,49	0,78	0,40	0,51	0,63
KIAA0895 protein	AB020702	1,26	1,22	1,04	1,35	1,26	1,74	E2IG2 protein	NM_004383	0,94	1,04	0,93	0,96	0,93	0,63
dual specificity phosphatase 1	NM_004417	1,37	1,45	1,01	1,48	1,34	1,74	HIV-1 Rev binding protein-like	NM_016565	0,70	0,73	0,99	0,85	0,90	0,63
aldo-keto reductase family 1, member D1 (delta 4-3-ketosteroid-5-beta-reductase)	NM_005989	1,25	1,09	1,00	1,48	1,64	1,75	glutathione peroxidase 3 (plasma)	AF015042	0,62	0,51	0,95	0,68	0,83	0,63
muscleblind-like 2 (Drosophila)	BE328496	1,36	1,31	1,01	1,13	1,06	1,75	phosphofructokinase, muscle	NM_002084	0,99	0,79	0,88	0,62	0,68	0,63
leucine zipper domain protein	NM_024589	1,11	1,09	0,97	1,05	1,05	1,77	mitochondrial ribosomal protein S27	U24183	0,66	0,60	1,21	0,89	0,94	0,63
C1q domain containing 1	NM_023925	0,99	1,11	1,06	1,34	1,44	1,78	FK506 binding protein 4, 59kDa	D87453	0,62	0,60	0,87	0,71	0,70	0,63
fucosidase, alpha-L-1, tissue	NM_000147	1,44	1,33	0,90	1,48	1,17	1,78	phosphoribosyl pyrophosphate synthetase 1	NM_002014	0,72	0,91	1,06	0,63	0,73	0,63
synaptogyrin 3	NM_004209	1,06	1,18	0,98	1,40	1,21	1,78	squamous cell carcinoma antigen recognised by T cells /// squamous cell carcinoma antigen recognised by T cells	NM_002764	0,72	0,84	0,93	0,40	0,49	0,63
protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 1A	NM_006741	0,66	0,80	1,10	0,74	1,06	1,78	transketolase (Wernicke-Korsakoff syndrome)	NM_005146	0,91	1,04	1,02	0,95	0,99	0,63
HEG homolog 1 (zebrafish)	AI148659	1,75	1,67	0,85	1,45	1,43	1,78	methylenetetrahydrofolate dehydrogenase (NADP+ dependent) 2,	BF696840	0,76	0,78	0,92	0,76	0,82	0,64
glutathione peroxidase 7	AA406605	0,98	1,77	0,96	0,94	0,92	1,78	methylenetetrahydrofolate cyclohydrolase chromosome 12 open reading frame 11	NM_006636	0,84	1,22	0,95	1,43	1,11	0,64
purinergic receptor P2X, ligand-gated ion channel, 4	NM_002560	1,29	1,17	1,02	1,06	0,93	1,79	translocase of inner mitochondrial membrane 8 homolog A (yeast)	AF274950	0,61	0,83	0,97	0,84	0,84	0,64
Kruppel-like factor 7 (ubiquitous)	AA488672	1,84	1,83	1,02	2,43	1,69	1,79	adenine phosphoribosyltransferase	NM_004085	0,77	0,79	1,02	0,83	0,94	0,64
hypothetical protein FLJ32731	NM_025070	1,43	1,23	0,94	1,10	1,00	1,79	guanine nucleotide binding protein-like 3 (nuclear)	NM_000485	0,73	0,73	1,01	0,78	0,87	0,64
contactin associated protein 1	NM_003632	1,07	1,14	1,06	1,37	1,26	1,80	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1A	NM_014366	0,73	0,78	1,02	0,88	0,98	0,64
myosin, light polypeptide 9, regulatory	NM_006097	4,51	2,38	0,93	3,31	2,18	1,81	palmitoyl-protein thioesterase 1 (ceroid- lipofuscinosis, neuronal 1, infantile)	NM_001065	0,82	0,75	0,88	0,70	0,74	0,64
glycine amidinotransferase (L-arginine:glycine amidinotransferase)	NM_001482	0,78	0,81	0,85	0,93	0,88	1,81	sphingosine kinase 1	NM_000310	1,07	1,15	0,90	1,44	1,25	0,64
angiomotin like 2	NM_016201	1,73	1,64	0,88	2,13	1,82	1,81	mitogen-activated protein kinase 6	NM_021972	0,64	0,49	0,77	0,58	0,60	0,64
FK506 binding protein 1B, 12,6 kDa	NM_004116	1,37	0,99	1,09	1,08	1,08	1,81	inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase complex-associated protein	NM_002748	0,77	0,98	0,94	0,80	0,82	0,64
hypothetical protein FLJ10770	NM_018211	1,62	1,21	0,94	1,66	1,44	1,81	peptide deformylase-like protein /// component of oligomeric golgi complex 8	AF153419	0,88	0,58	1,16	0,79	0,99	0,64
interleukin 18 (interferon-gamma-inducing factor)	NM_001562	2,03	0,99	0,89	2,68	2,01	1,82	proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type, 1	NM_022341	0,87	0,93	1,00	0,85	0,87	0,64
CD74 antigen (invariant polypeptide of major histocompatibility complex, class II antigen- associated)	K01144	1,41	1,18	1,02	1,30	1,18	1,82	hepcidin antimicrobial peptide	NM_002786	0,84	0,74	1,02	0,57	0,62	0,64
ral guanine nucleotide dissociation stimulator- like 1	AF186779	2,19	1,32	0,93	1,97	1,52	1,82	RNA binding motif protein 13 /// RNA binding motif protein 13	NM_021175	0,21	0,34	0,62	0,42	0,52	0,64
prominin 1	NM_006017	1,88	3,11	0,88	4,12	3,39	1,82	taxilin	AF251062	0,84	0,91	1,05	0,91	0,95	0,64
nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, epsilon	NM_004556	1,10	0,94	0,99	1,52	1,24	1,83	GrpE-like 1, mitochondrial (E. coli)	AL049795	0,72	0,86	0,96	0,95	0,96	0,64
Niemann-Pick disease, type C2	NM_006432	1,59	1,53	0,84	1,78	1,38	1,84		AL542571	0,79	0,62	1,00	0,88	0,90	0,64

Die Genexpression ist als x-fache Veränderung im Vergleich zu unbehandelten Zellen angegeben



# Fortsetzung Tabelle E: Gene, durch nonsense siRNA im Vergleich zu unbehandelten Zellen signifikant und biologisch relevant reguliert

Gen	'gene bank accession no.'	IGF-II ds1	IGF-II ds3	INSR ds1	IGF1R ds3	Rez. Mix	nonsense siRNA	Gen	'gene bank accession no.'	IGF-II ds1	IGF-II ds3	INSR ds1	IGF1R ds3	Rez. Mix	nonsense siRNA
annexin A4	NM_001153	0,70	0,77	0,61	0,58	0,54	1,84	solute carrier family 33 (acetyl-CoA transporter), member 1	BE464756	0,78	0,77	0,90	0,72	0,71	0,64
claudin 6	NM_021195	1,49	1,76	0,81	2,09	1,66	1,84	MYC induced nuclear antigen	A1823896	0,70	0,84	0,96	0,77	0,83	0,65
GATA binding protein 4	AV700724	0,89	0,84	0,91	0,99	1,04	1,85	mitochondrial translational initiation factor 2	NM_002453	0,75	0,66	1,10	0,77	0,85	0,65
hypothetical protein FLJ13725	NM_024519	1,68	1,26	0,90	1,28	1,21	1,85	hypothetical protein DKFZp564K0822 /// hypothetical protein DKFZp564K0822	NM_030796	0,75	1,11	0,95	0,98	0,94	0,65
CD59 antigen p18-20 (antigen identified by monoclonal antibodies 16.3A5, EJ16, EJ30, EL32 and G344)	BF983379	1,55	1,56	0,89	2,23	1,82	1,85	BRCA2 and CDKN1A interacting protein	NM_016567	0,73	0,92	0,94	0,57	0,60	0,65
discoidin domain receptor family, member 1	U48705	1,09	1,14	1,01	0,98	1,06	1,85	cytochrome P450, family 39, subfamily A, polypeptide 1	NM_016593	0,65	1,19	1,01	0,86	1,03	0,65
supervillin	NM_003174	2,02	1,74	1,02	1,68	1,41	1,86	gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, alpha 2	NM_000807	1,24	2,15	1,08	1,13	1,25	0,65
tropomyosin 1 (alpha)	NM_000366	1,46	1,86	0,82	1,80	1,41	1,87	CDC6 cell division cycle 6 homolog (S. cerevisiae)	U77949	0,55	0,66	0,92	0,51	0,69	0,65
carnitine O-octanoyltransferase	NM_021151	1,19	1,24	1,01	0,99	1,14	1,87	DKFZP564C186 protein	NM_015658	0,74	0,81	0,90	0,78	0,85	0,65
microsomal glutathione S-transferase 3	NM_004528	1,14	1,14	0,79	1,15	0,97	1,87	chromosome 4 open reading frame 9	R06783	0,54	0,81	0,98	0,76	0,78	0,65
bridging integrator 1	NM_004305	1,12	0,92	1,09	0,84	0,86	1,87	high density lipoprotein binding protein (vigilin)	NM_005336	0,84	0,85	0,89	0,72	0,78	0,65
chromosome 6 open reading frame 145	AK024828	1,82	1,83	1,01	1,56	1,45	1,88	serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade C (antithrombin), member 1	D29832	0,52	0,45	0,96	0,59	0,70	0,65
hypothetical protein FLJ20647	NM_017918	0,97	1,33	0,98	1,03	1,08	1,88	ST3 beta-galactoside alpha-2,3- sialyltransferase 6	AB022918	0,70	0,85	0,90	0,67	0,82	0,65
growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha	NM_001924	2,14	1,43	0,93	1,10	0,87	1,91	chemokine (C-C motif) receptor 6	NM_004367	0,71	0,52	0,92	0,62	0,70	0,65
heat shock 22kDa protein 8	AF133207	0,94	1,15	0,89	0,95	0,84	1,91	apolipoprotein A-II	NM_001643	0,73	0,67	0,92	0,89	0,99	0,65
chemokine (C-X-C motif) ligand 6 (granulocyte chemotactic protein 2)	NM_002993	0,58	3,09	0,76	1,58	1,43	1,92	DKFZP586A0522 protein	NM_014033	0,51	0,36	0,81	0,53	0,72	0,65
transporter 1, ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP)	NM_000593	1,24	1,02	1,06	1,15	1,04	1,93	GATA zinc finger domain containing 2A	AK024670	0,71	1,02	0,81	1,23	1,23	0,65
chemokine (C-X-C motif) ligand 10	NM_001565	0,79	0,82	1,19	1,01	1,02	1,94	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 3	NM_002809	0,76	0,80	0,90	0,67	0,70	0,65
zinc finger CCCH type domain containing 1	NM_022750	0,94	0,65	1,12	0,84	0,93	1,96	histidyl-tRNA synthetase	NM_002109	1,06	0,85	1,03	1,24	1,13	0,65
oculocutaneous albinism II (pink-eye dilution homolog, mouse)	NM_000275	0,77	1,13	0,98	0,70	0,79	1,96	DNA fragmentation factor, 45kDa, alpha polypeptide	NM_004401	0,80	0,81	0,93	0,72	0,81	0,65
heme binding protein 1	NM_015987	0,90	0,60	0,95	0,61	0,70	1,97	histone 1, H3d	NM_003530	0,77	1,51	0,92	1,42	1,14	0,66
lipase, hepatic	NM_000236	2,07	1,97	0,90	1,28	1,33	1,97	syndecan 1	Z48199	0,64	0,70	0,76	0,73	0,82	0,66
junction plakoglobin	NM_021991	2,09	1,34	0,92	1,91	1,63	1,98	glutaredoxin 2	NM_016066	0,95	0,63	0,98	0,78	0,87	0,66
calpain 7	BE349584	0,91	1,18	0,96	1,05	1,19	1,98	eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 9 eta, 116kDa	NM_003751	0,75	0,79	1,01	0,83	0,89	0,66
caveolin 1, caveolae protein, 22kDa	NM_001753	3,32	1,39	1,06	2,14	1,52	2,00	zinc fingers and homeoboxes 2	NM_014943	0,87	1,16	0,81	0,98	0,88	0,66
transforming growth factor beta 1 induced transcript 1	BC001830	3,84	2,92	1,02	3,46	2,18	2,00	chromosome 9 open reading frame 78 /// chromosome 9 open reading frame 78	NM_016520	1,04	0,98	0,91	1,10	1,03	0,66
SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily d, member 3	NM_003078	1,14	1,27	0,93	0,90	0,91	2,02	ubiquitin carboxyl-terminal esterase L1 (ubiquitin thiolesterase)	NM_004181	0,81	1,09	0,95	0,90	0,88	0,66
optineurin	AV757675	1,71	1,04	0,96	1,90	1,60	2,05	carbonic anhydrase XII	NM_001218	0,56	0,66	0,97	0,58	0,63	0,66
WAS protein family, member 3	AB020707	1,52	1,41	0,93	1,33	1,18	2,05	mercaptopyruvate sulfurtransferase	NM_021126	0,65	0,91	0,85	0,71	0,75	0,66
S100 calcium binding protein A10 (annexin II ligand, calpactin I, light polypeptide (p11))	NM_002966	1,63	1,14	0,74	1,44	1,12	2,07	low density lipoprotein receptor (familial hypercholesterolemia)	A1861942	1,02	0,79	0,92	1,13	0,96	0,66
ring finger protein 38	NM_022781	1,83	1,65	0,76	1,50	1,29	2,08	stromal cell protein	NM_018845	0,83	0,83	0,88	0,57	0,62	0,66
transgelin	NM_003186	7,20	6,23	0,75	11,63	6,09	2,11	GDP-mannose pyrophosphorylase A	NM_013335	0,67	0,67	1,09	0,57	0,68	0,66
tetraspanin 3	BC000704	1,20	1,53	0,88	2,00	1,67	2,13	exosome component 5	NM_020158	0,66	0,72	1,07	0,59	0,66	0,66
AMP-activated protein kinase family member 5	NM_014840	3,21	2,16	0,98	3,83	2,31	2,20	interferon-related developmental regulator 1	AA747426	0,95	0,93	1,05	1,08	0,91	0,66
tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3	A1738896	1,03	0,91	1,08	1,90	1,54	2,20	aldehyde dehydrogenase 4 family, member A1	NM_003748	0,66	0,66	0,77	0,56	0,60	0,66
immunoglobulin superfamily, member 3	AB007935	1,47	1,45	0,90	1,28	1,10	2,21	dyskeratosis congenita 1, dyskerin	U59151	0,63	0,78	1,08	0,89	0,94	0,66
epithelial membrane protein 3	NM_001425	2,46	1,31	1,16	1,40	1,19	2,25	glycogen synthase kinase 3 beta	BC000251	1,08	0,84	0,93	1,19	1,18	0,66
acheron	NM_018357	1,65	1,71	1,03	1,82	1,48	2,27	KIAA0152	BC000371	0,77	0,79	0,88	0,82	0,88	0,66
vitronectin (serum spreading factor, somatomedin B, complement S-protein)	NM_000638	1,50	0,67	0,91	1,30	1,21	2,31	hypothetical protein FLJ20272	NM_017735	0,84	0,78	1,06	0,81	0,84	0,66
sideroflexin 3	M95929	1,64	0,81	1,00	1,12	1,18	2,31	SLD5 homolog /// SLD5 homolog	BC005995	0,71	1,10	0,92	0,62	0,72	0,66
cadherin 2, type 1, N-cadherin (neuronal)	M34064	2,48	2,22	1,01	2,44	1,87	2,37	mitochondrial ribosomal protein S16	BE964789	0,80	0,74	1,03	0,64	0,67	0,66
LY6/PLAUR domain containing 1	AL567376	2,33	6,19	1,08	4,80	2,37	2,40	olfactomedin-like 3	NM_020190	0,89	0,90	0,71	1,68	1,41	0,66
nuclear factor of kappa light polypeptide gene	NM_020529	0,90	0,93	0,90	1,95	1,70	2,40	Ribosomal protein L11 /// Ribosomal protein	NM_000975	0,71	0,95	0,89	1,08	1,05	0,66

Die Genexpression ist als x-fache Veränderung im Vergleich zu unbehandelten Zellen angegeben



# Fortsetzung Tabelle E: Gene, durch nonsense siRNA im Vergleich zu unbehandelten Zellen signifikant und biologisch relevant reguliert

Gen	'gene bank accession no.'	IGF-II ds1	IGF-II ds3	INSR ds1	IGF1R ds3	Rez. Mix	nonsense siRNA	Gen	'gene bank accession no.'	IGF-II ds1	IGF-II ds3	INSR ds1	IGF1R ds3	Rez. Mix	nonsense siRNA
enhancer in B-cells inhibitor, alpha								L11							
chemokine (C-X-C motif) ligand 1 (melanoma growth stimulating activity, alpha)	NM_001511	1,10	4,58	0,85	2,04	2,21	2,45	signal sequence receptor, alpha (translocon-associated protein alpha)	NM_003144	0,83	0,71	0,90	0,50	0,61	0,66
chromosome 2 open reading frame 31 ///	NM_030804	1,76	2,16	0,86	2,17	1,89	2,47	glutamic-oxaloacetic transaminase 1, soluble (aspartate aminotransferase 1)	BC000498	0,50	0,50	0,95	0,58	0,70	0,66
serine protease inhibitor, Kunitz type 1	NM_003710	2,23	1,24	1,05	2,33	1,82	2,48	zinc finger with KRAB and SCAN domains 1	AA653300	0,80	0,90	0,87	0,97	1,04	0,66
aldehyde dehydrogenase 3 family, member A2	NM_000382	1,05	1,39	0,98	1,10	0,95	2,53	RAS p21 protein activator (GTPase activating protein) 1	NM_002890	0,74	0,67	1,00	0,99	1,05	0,66
solute carrier family 12 (sodium/potassium/chloride transporters), member 2	NM_001046	0,99	1,95	0,96	2,64	2,03	2,57	RuvB-like 1 (E. coli)	NM_003707	0,68	0,83	0,90	0,86	0,83	0,66
membrane protein, palmitoylated 1, 55kDa	NM_002436	1,28	0,91	1,15	1,45	1,34	2,59	succinate dehydrogenase complex, subunit B, iron sulfur (lp)	NM_003000	0,84	0,79	0,93	0,76	0,80	0,66
tubulin, alpha 3	AF141347	5,81	31,69	1,01	32,15	15,11	2,60	placenta-specific 8	NM_016619	2,24	1,21	0,82	0,90	1,08	0,66
annexin A3	M63310	3,92	2,41	0,83	2,85	2,42	2,61	opioid growth factor receptor	NM_007346	0,84	0,85	0,91	0,78	0,86	0,66
interleukin 8	NM_000584	1,93	1,30	1,13	1,39	1,30	2,62	tissue factor pathway inhibitor (lipoprotein-associated coagulation inhibitor)	J03225	1,25	0,87	0,92	1,23	1,38	0,66
hypothetical protein FLJ10847	NM_018242	0,77	0,89	0,81	0,66	0,65	2,63								
chemokine (C-X3-C motif) ligand 1	NM_002996	1,14	1,04	0,91	3,58	2,71	2,64								
tubulin, beta polypeptide paralog	AL533838	2,68	6,41	0,88	2,10	1,38	2,77								
alanyl (membrane) aminopeptidase (aminopeptidase N, aminopeptidase M, microsomal aminopeptidase, CD13, p150)	NM_001150	1,59	1,11	0,91	1,00	1,00	2,88								
syndecan 4 (amphiglycan, ryudocan)	NM_002999	1,26	1,02	0,97	1,43	1,34	3,03								
caveolin 2	BF197655	3,26	1,62	0,98	0,87	0,85	3,07								
homeo box A5	NM_019102	0,70	1,36	0,96	1,91	1,43	3,12								
neutrophil cytosolic factor 2 (65kDa, chronic granulomatous disease, autosomal 2)	BC001606	2,87	2,31	1,07	6,47	4,28	3,20								
folistatin-like 3 (secreted glycoprotein)	NM_005860	1,64	1,45	1,03	1,42	1,25	3,41								
suppressor of cytokine signaling 2	NM_003877	3,67	2,22	1,27	2,94	2,27	3,69								
natriuretic peptide precursor B	NM_002521	13,35	8,68	1,00	12,41	10,64	3,93								
ubiquitin D	NM_006398	1,92	1,11	0,98	7,32	6,05	6,08								

Die Genexpression ist als x-fache Veränderung im Vergleich zu unbehandelten Zellen angegeben



Tabelle F: Gene, durch IGF1R und AUCH durch IGF-II reguliert

Gen	'gene bank accession no.'	IGF-II ds1	IGF-II ds3	INSR ds1	IGF1R ds3	Rez. Mix	nonsense siRNA
fatty acid binding protein 1, liver	NM_001443	0,50	0,64	0,70	0,37	0,43	0,74
carbonic anhydrase II	M36532	0,45	0,48	0,88	0,38	0,51	0,71
NAD(P)H dehydrogenase, quinone 2	NM_000904	0,57	0,53	0,92	0,42	0,48	0,78
scavenger receptor class B, member 1	NM_005505	0,55	0,59	0,92	0,49	0,63	0,89
complement component 3	NM_000064	0,19	0,31	0,94	0,50	0,66	0,83
nuclear protein E3-3	BC002873	0,58	0,59	0,97	0,50	0,61	0,72
hypothetical protein FLJ22390	NM_022746	0,44	0,62	0,93	0,50	0,60	0,68
glutamate dehydrogenase 1	AI339331	0,63	0,63	0,82	0,52	0,73	1,11
serum amyloid A4, constitutive	NM_006512	0,25	0,17	0,81	0,55	0,80	0,70
solute carrier family 25 (carnitine/acylcarnitine translocase), member 20	BC001689	0,55	0,56	0,94	0,58	0,64	0,75
NFS1 nitrogen fixation 1 (S. cerevisiae)	NM_021100	0,63	0,53	0,94	0,60	0,68	0,68
A kinase (PRKA) anchor protein 2 /// PALM2-AKAP2 protein	NM_007203	0,64	0,64	0,80	0,61	0,68	0,70
transferrin	NM_001063	0,60	0,61	0,90	0,62	0,69	0,92
annexin A9	AF230929	0,54	0,63	0,85	0,63	0,75	0,70
ATPase, Ca++ transporting, plasma membrane 2	R52647	0,58	0,58	0,88	0,64	0,87	0,75
complement component 4 binding protein, beta	NM_000716	0,44	0,32	0,84	0,64	0,76	0,75
CGI-49 protein	NM_016002	0,51	0,64	0,85	0,64	0,72	0,77
collagen, type I, alpha 1	K01228	2,34	1,77	1,13	1,52	1,45	1,22
tensin-like SH2 domain containing 1	NM_022748	1,51	1,84	0,95	1,58	1,48	1,46
family with sequence similarity 46, member A	AW246673	1,91	2,25	0,95	1,59	1,44	1,22
kinesin family member 3C	AF035621	1,73	1,72	1,06	1,61	1,34	1,15
calponin 2	NM_004368	1,99	1,70	0,96	1,61	1,34	1,21
NCK adaptor protein 2	BC000103	1,54	1,65	0,84	1,61	1,35	1,27
Desmoglein 2	NM_001943	2,12	1,66	0,93	1,62	1,42	1,43
Rho-related BTB domain containing 1	AB018283	1,86	1,85	0,94	1,65	1,26	0,98
RNA binding motif, single stranded interacting protein 1	NM_016839	1,99	1,59	0,84	1,65	1,47	1,42
keratin 19	NM_002276	2,88	1,77	1,25	1,65	1,44	1,00
myosin, heavy polypeptide 9, non-muscle	AI827941	1,91	1,59	0,87	1,68	1,45	1,30
microtubule associated monooxygenase, calponin and LIM domain containing 1	NM_022765	2,17	1,71	1,05	1,69	1,24	1,20
drebrin 1	NM_004395	1,54	1,75	0,85	1,69	1,57	0,88
polo-like kinase 2 (Drosophila)	NM_006622	2,04	1,54	1,04	1,70	1,28	0,91
dickkopf homolog 1 (Xenopus laevis)	NM_012242	1,61	2,19	1,33	1,74	1,73	1,17
cadherin 6, type 2, K-cadherin (fetal kidney)	NM_004932	1,93	2,12	1,09	1,75	1,54	1,46

Die Genexpression ist als x-fache Veränderung im Vergleich zu unbehandelten Zellen angegeben



### Fortsetzung Tabelle F: Gene, durch IGF1R und AUCH durch IGF-II reguliert

Gen	'gene bank accession no.'	IGF-II ds1	IGF-II ds3	INSR ds1	IGF1R ds3	Rez. Mix	nonsense siRNA
tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (erythroid potentiating activity, collagenase inhibitor)	NM_003254	2,89	1,67	1,03	1,75	1,45	1,40
limitrin	AW888223	2,46	1,88	0,92	1,78	1,49	1,22
headcase homolog (Drosophila)	NM_016217	1,51	1,55	0,96	1,81	1,52	1,27
formin binding protein 1-like	AW270932	1,67	1,83	0,82	1,85	1,46	1,19
protocadherin 17	NM_014459	1,57	2,29	0,98	1,85	2,02	0,78
testis derived transcript (3 LIM domains)	NM_015641	1,80	1,59	0,84	1,87	1,29	1,04
cytochrome P450, family 26, subfamily B, polypeptide 1	NM_019885	2,70	3,45	1,03	1,87	1,92	1,06
Rho family GTPase 3	BG054844	1,88	1,57	1,04	1,88	1,84	1,07
Microtubule-associated protein 1B	AL523076	1,74	2,59	1,09	1,93	1,37	0,98
dihydropyrimidinase-like 2	NM_001386	2,05	2,12	0,85	1,94	1,67	1,20
CK2 interacting protein 1; HQ0024c protein	NM_016274	1,77	2,18	0,88	1,95	1,50	1,30
dihydropyrimidinase-like 3	W72516	1,51	1,84	1,11	2,01	1,58	1,08
ring finger protein 44	NM_014901	1,60	1,98	0,96	2,05	1,73	1,27
latent transforming growth factor beta binding protein 1	AI986120	2,26	2,33	1,17	2,14	2,06	1,16
ATPase, Ca++ transporting, plasma membrane 1	L14561	1,80	2,01	0,92	2,21	1,87	1,26
cysteine-rich, angiogenic inducer, 61	NM_001554	3,67	1,88	1,09	2,21	1,82	1,11
transforming growth factor, beta 2	M19154	1,81	1,58	1,10	2,22	1,57	1,04
prostaglandin E receptor 4 (subtype EP4)	AI675173	1,52	4,38	0,99	2,33	2,26	1,24
insulin-like growth factor binding protein 2, 36kDa	NM_000597	2,76	2,23	0,82	2,34	2,01	1,00
fibronectin leucine rich transmembrane protein 3	NM_013281	2,02	2,15	0,81	2,39	1,48	1,37
BTB and CNC homology 1, basic leucine zipper transcription factor 2	AK027193	1,96	1,67	0,99	2,46	1,76	1,20
A kinase (PRKA) anchor protein (gravin) 12	AB003476	5,16	2,71	0,94	2,67	1,64	1,43
amphiregulin (schwannoma-derived growth factor)	NM_001657	1,84	6,58	0,90	2,76	2,23	1,34
platelet derived growth factor C	NM_016205	1,93	1,96	0,85	2,79	2,17	1,14
downregulated in ovarian cancer 1	NM_014890	1,95	2,09	0,86	2,97	1,81	1,16
four and a half LIM domains 2	NM_001450	4,54	2,06	1,14	2,99	2,04	1,42
I factor (complement)	NM_000204	0,64	0,63	0,81	3,00	2,25	0,91
actin, alpha 1, skeletal muscle	NM_001100	4,03	4,18	0,96	3,35	2,00	1,39
leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 5	AF062006	2,01	2,11	1,34	3,38	2,86	1,12
chondroitin sulfate proteoglycan 2 (versican)	BF590263	4,24	4,27	0,95	3,86	2,62	1,48
calponin 1, basic, smooth muscle	NM_001299	3,98	2,61	1,02	5,32	2,70	1,46
complement component 3	NM_000064	0,50	0,64	0,70	0,37	0,43	0,74

Die Genexpression ist als x-fache Veränderung im Vergleich zu unbehandelten Zellen angegeben

**Tabelle G: Gene, durch Rez. Mix und AUCH durch IGF-II reguliert**

Gen	'gene bank accession no.'	IGF-II ds1	IGF-II ds3	INSR ds1	IGF1R ds3	Rez. Mix	nonsense siRNA
carbonic anhydrase II	M36532	0,57	0,53	0,92	0,42	0,48	0,78
NAD(P)H dehydrogenase, quinone 2	NM_000904	0,45	0,48	0,88	0,38	0,51	0,71
solute carrier family 25 (carnitine/acylcarnitine translocase), member 20	BC001689	0,44	0,62	0,93	0,50	0,60	0,68
nuclear protein E3-3	BC002873	0,58	0,59	0,97	0,50	0,61	0,72
scavenger receptor class B, member 1	NM_005505	0,55	0,59	0,92	0,49	0,63	0,89
hypothetical protein FLJ22390	NM_022746	0,55	0,56	0,94	0,58	0,64	0,75
I factor (complement)	NM_000204	0,19	0,31	0,94	0,50	0,66	0,83
fatty acid binding protein 1, liver	NM_001443	1,77	2,18	0,88	1,95	1,50	1,30
headcase homolog (Drosophila)	NM_016217	1,51	1,55	0,96	1,81	1,52	1,27
Rho family GTPase 3	BG054844	1,93	2,12	1,09	1,75	1,54	1,46
transforming growth factor, beta 2	M19154	1,81	1,58	1,10	2,22	1,57	1,04
BTB and CNC homology 1, basic leucine zipper transcription factor 2	AK027193	1,54	1,75	0,85	1,69	1,57	0,88
drebrin 1	NM_004395	1,51	1,84	1,11	2,01	1,58	1,08
dihydropyrimidinase-like 3	W72516	5,16	2,71	0,94	2,67	1,64	1,43
cysteine-rich, angiogenic inducer, 61	NM_001554	2,05	2,12	0,85	1,94	1,67	1,20
platelet derived growth factor C	NM_016205	1,60	1,98	0,96	2,05	1,73	1,27
ring finger protein 44	NM_014901	1,61	2,19	1,33	1,74	1,73	1,17
ATPase, Ca++ transporting, plasma membrane 1	L14561	1,96	1,67	0,99	2,46	1,76	1,20
four and a half LIM domains 2	NM_001450	1,95	2,09	0,86	2,97	1,81	1,16
downregulated in ovarian cancer 1	NM_014890	3,67	1,88	1,09	2,21	1,82	1,11
leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 5	AF062006	1,88	1,57	1,04	1,88	1,84	1,07
cadherin 6, type 2, K-cadherin (fetal kidney)	NM_004932	1,80	2,01	0,92	2,21	1,87	1,26
dihydropyrimidinase-like 2	NM_001386	2,70	3,45	1,03	1,87	1,92	1,06
CK2 interacting protein 1; HQ0024c protein	NM_016274	4,03	4,18	0,96	3,35	2,00	1,39
dickkopf homolog 1 (Xenopus laevis)	NM_012242	2,76	2,23	0,82	2,34	2,01	1,00
insulin-like growth factor binding protein 2, 36kDa	NM_000597	1,57	2,29	0,98	1,85	2,02	0,78
protocadherin 17	NM_014459	4,54	2,06	1,14	2,99	2,04	1,42
latent transforming growth factor beta binding protein 1	AI986120	2,26	2,33	1,17	2,14	2,06	1,16
calponin 1, basic, smooth muscle	NM_001299	1,93	1,96	0,85	2,79	2,17	1,14
A kinase (PRKA) anchor protein (gravin) 12	AB003476	1,84	6,58	0,90	2,76	2,23	1,34
cytochrome P450, family 26, subfamily B, polypeptide 1	NM_019885	0,64	0,63	0,81	3,00	2,25	0,91
actin, alpha 1, skeletal muscle	NM_001100	1,52	4,38	0,99	2,33	2,26	1,24

Die Genexpression ist als x-fache Veränderung im Vergleich zu unbehandelten Zellen angegeben



Fortsetzung Tabelle G: Gene, durch Rez. Mix und AUCH durch IGF-II reguliert

Gen	'gene bank accession no.'	IGF-II ds1	IGF-II ds3	INSR ds1	IGF1R ds3	Rez. Mix	nonsense siRNA
chondroitin sulfate proteoglycan 2 (versican)	BF590263	4,24	4,27	0,95	3,86	2,62	1,48
prostaglandin E receptor 4 (subtype EP4)	AI675173	3,98	2,61	1,02	5,32	2,70	1,46
amphiregulin (schwannoma-derived growth factor)	NM_001657	2,01	2,11	1,34	3,38	2,86	1,12



Tabelle H: Gene, durch IGF1R und AUCH durch INSR reguliert

Gen	'gene bank accession no.'	IGF-II ds1	IGF-II ds3	INSR ds1	IGF1R ds3	Rez. Mix	nonsense siRNA
fatty acid desaturase 1	BE540552	0,53	1,09	0,60	0,38	0,42	0,75



Tabelle I: Gene, durch Rez. Mix und AUCH durch IGF1R reguliert

Gen	'gene bank accession no.'	IGF-II ds1	IGF-II ds3	INSR ds1	IGF1R ds3	Rez. Mix	nonsense siRNA
synaptobrevin-like 1	NM_005638	0,95	0,82	0,92	0,32	0,45	0,95
mutS homolog 2, colon cancer, nonpolyposis type 1 (E. coli)	U04045	0,88	1,03	0,91	0,33	0,39	0,87
LR8 protein	NM_014020	0,52	0,84	0,70	0,33	0,40	1,41
likely ortholog of mouse hypoxia induced gene 1	NM_014056	1,04	0,82	0,83	0,34	0,42	0,94
alanyl-tRNA synthetase	NM_001605	0,64	0,83	1,00	0,35	0,40	0,72
fatty acid binding protein 1, liver	NM_001443	0,50	0,64	0,70	0,37	0,43	0,74
inositol(myo)-1(or 4)-monophosphatase 2	NM_014214	0,95	1,03	0,83	0,37	0,41	1,11
cytochrome c oxidase subunit VIIa polypeptide 2 like	NM_004718	0,98	0,83	0,90	0,38	0,40	1,15
carbonic anhydrase II	M36532	0,45	0,48	0,88	0,38	0,51	0,71
fatty acid desaturase 1	BE540552	0,53	1,09	0,60	0,38	0,42	0,75
male-enhanced antigen	NM_014623	0,96	0,87	0,87	0,38	0,49	0,77
HSPC009 protein	NM_014019	0,76	0,87	0,97	0,38	0,45	0,78
solute carrier family 22 (organic cation transporter), member 18	NM_002555	0,90	0,58	1,00	0,40	0,46	0,80
solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; ornithine transporter) member 15	NM_014252	0,71	0,58	0,90	0,40	0,52	0,72
growth hormone inducible transmembrane protein	AL136713	0,78	0,84	0,87	0,41	0,52	0,88
transforming, acidic coiled-coil containing protein 1	NM_006283	0,86	0,84	0,84	0,42	0,53	0,71
aminoacylase 1	NM_000666	0,70	0,52	0,96	0,42	0,50	0,90
NAD(P)H dehydrogenase, quinone 2	NM_000904	0,57	0,53	0,92	0,42	0,48	0,78
pyruvate dehydrogenase complex, component X	NM_003477	0,86	0,62	0,91	0,42	0,56	0,83

Die Genexpression ist als x-fache Veränderung im Vergleich zu unbehandelten Zellen angegeben



### Fortsetzung Tabelle I: Gene, durch Rez. Mix und AUCH durch IGF1R reguliert

Gen	'gene bank accession no.'	IGF-II ds1	IGF-II ds3	INSR ds1	IGF1R ds3	Rez. Mix	nonsense siRNA
pro-oncosis receptor inducing membrane injury gene	BG538627	1,12	0,91	0,85	0,43	0,59	0,99
dicarbonyl/L-xylulose reductase	NM_016286	0,63	0,69	0,90	0,43	0,52	0,86
phosphorylase, glycogen; liver (Hers disease, glycogen storage disease type VI)	NM_002863	0,68	0,45	0,83	0,43	0,55	1,15
phosphoglucomutase 1	NM_002633	0,75	0,78	0,96	0,45	0,57	1,18
clathrin, light polypeptide (Lca)	NM_007096	0,97	0,98	0,80	0,45	0,45	0,98
fumarylacetoacetate hydrolase (fumarylacetoacetase)	NM_000137	0,70	0,56	0,94	0,45	0,51	0,72
TAF12 RNA polymerase II, TATA box binding protein (TBP)-associated factor, 20kDa	D50544	0,86	0,82	1,00	0,46	0,51	0,79
biliverdin reductase B (flavin reductase (NADPH))	NM_000713	0,83	0,49	0,91	0,46	0,46	0,68
procollagen-lysine, 2-oxoglutarate 5-dioxygenase 2	AI754404	0,85	1,24	0,96	0,46	0,59	1,08
v-myb myeloblastosis viral oncogene homolog (avian)-like 2	NM_002466	0,72	1,07	0,85	0,47	0,59	0,88
heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3 pseudogene 1	NM_005758	0,84	1,07	0,96	0,47	0,60	1,16
CGI-119 protein	NM_016056	0,94	0,94	0,80	0,47	0,53	0,90
solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; citrate transporter), member 1	U25147	0,55	0,75	0,80	0,48	0,55	0,86
crystallin, zeta (quinone reductase)	NM_001889	0,95	0,63	0,86	0,48	0,62	0,77
TNF receptor-associated protein 1	NM_016292	0,66	0,73	1,00	0,49	0,64	0,69
R3H domain (binds single-stranded nucleic acids) containing	NM_015361	0,98	0,87	0,82	0,49	0,57	0,90
CD302 antigen	NM_014880	0,80	0,70	0,80	0,49	0,65	0,67
scavenger receptor class B, member 1	NM_005505	0,55	0,59	0,92	0,49	0,63	0,89
polymerase (DNA directed), epsilon 3 (p17 subunit)	BC004170	0,64	0,77	0,86	0,49	0,64	0,76
mitochondrial ribosomal protein L9	BC004517	0,92	0,98	0,87	0,50	0,53	0,85
complement component 3	NM_000064	0,19	0,31	0,94	0,50	0,66	0,83
putative MAPK activating protein	AI983505	1,16	0,95	0,96	0,50	0,55	1,02
nuclear protein E3-3	BC002873	0,58	0,59	0,97	0,50	0,61	0,72
glutathione S-transferase A4	NM_001512	0,60	0,86	0,89	0,50	0,58	0,70
hypothetical protein FLJ22390	NM_022746	0,44	0,62	0,93	0,50	0,60	0,68
E-1 enzyme	NM_021204	0,76	0,78	0,91	0,51	0,63	0,82
NAD(P)H:quinone oxidoreductase type 3, polypeptide A2	NM_016243	1,14	0,88	0,96	0,51	0,55	0,73
membrane cofactor protein (CD46, trophoblast-lymphocyte cross-reactive antigen)	NM_002389	0,86	0,78	0,85	0,52	0,54	1,03
phytanoyl-CoA hydroxylase (Refsum disease)	NM_006214	0,77	0,87	0,89	0,52	0,64	0,87
serum/glucocorticoid regulated kinase-like	NM_013257	0,94	0,70	0,91	0,52	0,55	1,11
protein disulfide isomerase-associated 4	BC000425	0,66	0,91	0,90	0,52	0,63	0,70
chromosome 21 open reading frame 45	NM_018944	0,77	0,97	0,93	0,52	0,59	1,05
epoxide hydrolase 2, cytoplasmic	AF233336	0,68	0,64	0,93	0,52	0,56	0,87
bleomycin hydrolase	NM_000386	0,91	0,80	0,97	0,53	0,64	0,73
sterol-C4-methyl oxidase-like	U93162	0,82	0,72	0,76	0,53	0,56	0,96
septin 10	BF966021	0,96	1,09	0,81	0,53	0,54	0,83

Die Genexpression ist als x-fache Veränderung im Vergleich zu unbehandelten Zellen angegeben

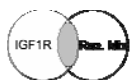




# Fortsetzung Tabelle I: Gene, durch Rez. Mix und AUCH durch IGF1R reguliert

Gen	'gene bank accession no.'	IGF-II ds1	IGF-II ds3	INSR ds1	IGF1R ds3	Rez. Mix	nonsense siRNA
3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase 1 (soluble)	NM_002130	0,72	0,77	0,91	0,53	0,66	0,80
peroxisomal D3,D2-enoyl-CoA isomerase	NM_006117	0,78	0,58	0,93	0,53	0,60	0,77
galactose-1-phosphate uridylyltransferase	NM_000155	0,69	0,66	1,04	0,54	0,62	1,02
cytochrome c-1	NM_001916	0,45	0,72	1,01	0,54	0,65	0,85
GPAA1P anchor attachment protein 1 homolog (yeast)	NM_003801	0,84	0,93	0,94	0,54	0,63	0,73
aprataxin	NM_017692	0,70	0,81	0,92	0,54	0,58	0,87
acetyl-Coenzyme A acetyltransferase 2 (acetoacetyl Coenzyme A thiolase)	BC000408	0,66	0,78	0,76	0,54	0,57	0,77
interleukin-1 receptor-associated kinase 1	NM_001569	0,89	0,89	0,98	0,54	0,60	0,70
biphenyl hydrolase-like (serine hydrolase; breast epithelial mucin-associated antigen)	NM_004332	0,94	1,01	0,93	0,55	0,57	1,09
solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; oxoglutarate carrier), member 11	NM_003562	0,51	0,84	0,93	0,55	0,64	0,82
fibroblast growth factor receptor 4	NM_002011	0,65	0,70	0,87	0,55	0,61	0,76
3-hydroxymethyl-3-methylglutaryl-Coenzyme A lyase (hydroxymethylglutaricaciduria)	NM_000191	0,87	0,94	0,98	0,55	0,62	1,09
mitogen-activated protein kinase 9	W37431	0,85	1,01	0,83	0,55	0,62	1,02
butyrophilin, subfamily 3, member A2	BC002832	0,91	0,65	0,97	0,55	0,62	0,72
adiponutrin	NM_025225	0,70	0,88	0,75	0,56	0,59	0,78
exosome component 2	BC000747	0,71	0,76	0,98	0,56	0,61	0,68
DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 3 beta	NM_006892	0,84	0,93	0,96	0,56	0,65	1,35
chromosome 21 open reading frame 33	NM_004649	0,81	0,92	0,98	0,56	0,59	0,83
outer mitochondrial membrane cytochrome b5	AW235051	0,90	0,85	0,80	0,56	0,61	0,88
selenoprotein X, 1	NM_016332	0,78	0,60	0,91	0,56	0,66	0,80
phosphatidylinositol glycan, class F	NM_002643	0,91	0,76	0,92	0,56	0,63	0,88
N-acetylneuraminic acid synthase (sialic acid synthase)	NM_018946	0,54	0,75	0,89	0,57	0,62	0,69
immature colon carcinoma transcript 1	NM_001545	0,79	0,73	0,94	0,57	0,64	0,69
ELOVL family member 6, elongation of long chain fatty acids (FEN1/Elo2, SUR4/Elo3-like, yeast)	NM_024090	0,85	0,98	0,86	0,57	0,62	0,88
ribonuclease H2, large subunit	NM_006397	0,84	1,07	0,90	0,57	0,65	0,75
CDNA FLJ42949 fis, clone BRSTN2006583	AL109716	0,69	0,64	0,78	0,57	0,61	0,87
NHL repeat containing 2	NM_017687	0,77	0,94	0,88	0,57	0,61	0,95
phosphoribosylaminoimidazole carboxylase, phosphoribosylaminoimidazole succinocarboxamide synthetase	AA902652	0,68	0,77	0,86	0,58	0,65	0,68
enoyl Coenzyme A hydratase domain containing 3	NM_024693	0,58	0,79	0,91	0,58	0,61	1,14
phenylalanine hydroxylase	NM_000277	0,54	0,85	0,83	0,58	0,65	0,78
NAD(P)H dehydrogenase, quinone 1	AI039874	0,80	0,46	0,87	0,58	0,66	0,73
solute carrier family 25 (carnitine/acylcarnitine translocase), member 20	BC001689	0,55	0,56	0,94	0,58	0,64	0,75
homogentisate 1,2-dioxygenase (homogentisate oxidase)	NM_000187	0,65	0,74	0,93	0,58	0,63	0,82
uncoupling protein 2 (mitochondrial, proton carrier)	U94592	1,00	0,88	0,81	0,59	0,62	0,90
tetratricopeptide repeat domain 15	NM_016030	0,84	0,84	0,96	0,59	0,62	0,71

Die Genexpression ist als x-fache Veränderung im Vergleich zu unbehandelten Zellen angegeben



Fortsetzung Tabelle I: Gene, durch Rez. Mix und AUCH durch IGF1R reguliert

Gen	'gene bank accession no.'	IGF-II ds1	IGF-II ds3	INSR ds1	IGF1R ds3	Rez. Mix	nonsense siRNA
sialidase 1 (lysosomal sialidase)	U84246	1,23	0,99	0,79	0,59	0,54	1,30
asparagine-linked glycosylation 6 homolog (yeast, alpha-1,3-glucosyltransferase)	NM_013339	0,89	0,76	0,92	0,59	0,63	0,81
queuine tRNA-ribosyltransferase 1 (tRNA-guanine transglycosylase) /// queuine tRNA-ribosyltransferase 1 (tRNA-guanine transglycosylase)	NM_031209	0,76	0,87	1,02	0,59	0,63	0,85



Tabelle J: Gene, durch Rez. Mix und AUCH durch INSR reguliert

Gen	'gene bank accession no.'	IGF-II ds1	IGF-II ds3	INSR ds1	IGF1R ds3	Rez. Mix	nonsense siRNA
fatty acid desaturase 1	BE540552	0,53	1,09	0,60	0,38	0,42	0,75
amyloid beta (A4) precursor protein (protease nexin-II, Alzheimer disease)	NM_000484	1,30	0,91	0,64	1,45	1,50	0,88



Tabelle K: Gene, spezifisch durch IGF1R reguliert

Gen	'gene bank accession no.'	IGF-II ds1	IGF-II ds3	INSR ds1	IGF1R ds3	Rez. Mix	nonsense siRNA
chromosome 20 open reading frame 59	NM_022082	0,91	0,55	0,95	0,51	0,69	0,88
antigen identified by monoclonal antibody Ki-67	AU152107	0,71	0,89	0,95	0,52	0,68	0,79
cyclin-dependent kinase inhibitor 3 (CDK2-associated dual specificity phosphatase)	AF213033	0,96	0,85	0,93	0,53	0,70	0,87
acetyl-Coenzyme A acetyltransferase 1 (acetoacetyl Coenzyme A thiolase)	NM_000019	0,66	0,83	0,94	0,53	0,67	0,80
dihydropyrimidine dehydrogenase	NM_000110	0,54	0,83	0,92	0,54	0,71	0,67
primase, polypeptide 1, 49kDa	NM_000946	0,82	1,11	1,01	0,55	0,71	0,76
McKusick-Kaufman syndrome	NM_018848	0,72	1,10	0,95	0,55	0,69	0,96
aurora kinase B	AB011446	0,79	1,00	0,89	0,55	0,72	0,79
COMM domain containing 8	NM_017845	0,86	0,85	0,88	0,56	0,75	0,87
START domain containing 7 /// START domain containing 7	NM_020151	0,83	0,91	0,95	0,56	0,70	1,01
L-3-hydroxyacyl-Coenzyme A dehydrogenase, short chain	BC000306	0,62	0,86	0,91	0,57	0,68	0,89
coronin, actin binding protein, 2A	NM_003389	0,73	0,68	0,90	0,57	0,67	1,38
thiosulfate sulfurtransferase (rhodanese)	D87292	0,61	0,78	1,04	0,57	0,72	1,11
Fukuyama type congenital muscular dystrophy (fukutin)	NM_006731	0,87	0,86	0,89	0,57	0,67	0,89
erythrocyte membrane protein band 4.1 like 4B	NM_019114	0,71	0,52	0,94	0,57	0,69	0,92
cyclin A2	NM_001237	0,81	0,73	0,89	0,57	0,79	0,76
SLC2A4 regulator	BE898559	0,64	0,68	0,74	0,58	0,72	0,79
KIAA0664 protein	AB014564	0,67	0,65	1,00	0,59	0,75	0,73

Die Genexpression ist als x-fache Veränderung im Vergleich zu unbehandelten Zellen angegeben



Tabelle K: Gene, spezifisch durch IGF1R reguliert

Gen	'gene bank accession no.'	IGF-II ds1	IGF-II ds3	INSR ds1	IGF1R ds3	Rez. Mix	nonsense siRNA
nucleobindin 2	NM_005013	0,94	0,94	0,93	0,59	0,68	0,83
Cell division cycle 2, G1 to S and G2 to M	AL524035	1,00	1,17	0,94	0,59	0,75	0,93
adenylosuccinate synthase	AA628948	1,04	0,99	0,90	0,59	0,67	0,82
nuclear receptor subfamily 1, group H, member 3	NM_005693	0,68	0,61	0,93	0,59	0,70	0,71
RA-regulated nuclear matrix-associated protein	AK001261	0,77	1,18	0,91	0,59	0,77	0,79
LYRIC/3D3	AI886796	0,59	0,72	0,92	0,59	0,70	0,73
DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 18	NM_006773	0,80	0,83	1,01	0,60	0,72	0,72
NADH dehydrogenase (ubiquinone) flavoprotein 1, 51kDa	AF092131	0,71	0,86	0,96	0,60	0,69	0,98
ligatin	NM_006893	0,71	0,78	1,02	0,60	0,68	0,73
small nuclear ribonucleoprotein polypeptide C	NM_003093	0,89	0,88	0,95	0,60	0,72	0,88
chromosome 14 open reading frame 94	NM_017815	0,87	0,86	0,98	0,61	0,68	0,96
carbonic reductase 4	AL049442	0,95	1,15	1,01	0,61	0,79	0,97
PDZ binding kinase	NM_018492	0,76	0,88	0,96	0,61	0,76	0,91
nidogen (enactin)	BF940043	0,87	1,11	0,74	0,61	0,75	0,89
galactokinase 1	BG474736	0,75	0,75	0,94	0,61	0,70	0,98
chromosome condensation protein G	NM_022346	0,67	0,99	0,91	0,61	0,71	0,69
proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type, 10	NM_002801	0,75	0,69	1,13	0,62	0,69	0,91
hypothetical protein FLJ20364	AF269167	0,52	0,85	1,02	0,62	0,74	0,74
arylacetamide deacetylase (esterase)	NM_001086	0,67	0,71	1,08	0,62	0,83	0,92
inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase A	NM_002220	0,74	0,65	1,00	0,62	0,69	1,11
ER degradation enhancer, mannosidase alpha-like 1	NM_014674	0,92	0,73	0,92	0,62	0,70	0,99
protein kinase, DNA-activated, catalytic polypeptide	U47077	0,73	0,94	0,94	0,62	0,73	0,78
hypothetical protein MGC21416	BE673723	0,95	1,15	0,96	0,62	0,67	0,96
kinesin family member 14	NM_014875	0,91	0,97	0,80	0,62	0,76	0,79
aldehyde dehydrogenase 6 family, member A1	BG399778	0,68	0,79	0,84	0,62	0,72	0,78
polymerase (DNA directed), epsilon 2 (p59 subunit)	NM_002692	0,81	0,78	0,93	0,62	0,73	0,83
deoxythymidylate kinase (thymidylate kinase)	NM_012145	0,71	0,90	0,99	0,62	0,70	0,74
origin recognition complex, subunit 3-like (yeast)	AF125507	0,92	0,83	0,93	0,62	0,76	0,74
coenzyme Q3 homolog, methyltransferase (yeast) /// coenzyme Q3 homolog, methyltransferase (yeast)	NM_017421	0,78	0,74	0,95	0,62	0,76	0,72
RNA-binding region (RNP1, RRM) containing 1 /// RNA-binding region (RNP1, RRM) containing 1	AL109955	0,77	1,04	0,95	0,62	0,67	0,88
MCM6 minichromosome maintenance deficient 6 (MIS5 homolog, S. pombe) (S. cerevisiae)	NM_005915	0,83	1,13	0,93	0,62	0,78	0,86
KIAA0376 protein	AB002374	1,03	1,02	0,90	0,62	0,68	0,98
inhibitor of Bruton agammaglobulinemia tyrosine kinase	AF235049	1,07	0,88	0,85	0,62	0,69	0,97
sema domain, immunoglobulin domain (Ig), transmembrane domain (TM) and short cytoplasmic domain, (semaphorin) 4G	NM_018121	0,86	0,60	0,90	0,62	0,73	0,87
ATPase, H+ transporting, lysosomal 70kDa, V1 subunit A	NM_001690	0,79	0,74	0,85	0,62	0,78	0,85

Die Genexpression ist als x-fache Veränderung im Vergleich zu unbehandelten Zellen angegeben



### Fortsetzung Tabelle K: Gene, spezifisch durch IGF1R reguliert

Gen	'gene bank accession no.'	IGF-II ds1	IGF-II ds3	INSR ds1	IGF1R ds3	Rez. Mix	nonsense siRNA
1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase 5 (lysophosphatidic acid acyltransferase, epsilon)	NM_018361	0,95	0,94	0,98	0,62	0,69	0,87
anaphase promoting complex subunit 5 /// anaphase promoting complex subunit 5	T33068	0,76	0,88	0,93	0,62	0,70	0,83
serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade F (alpha-2 antiplasmin, pigment epithelium derived factor), member 2	NM_000934	0,83	0,66	0,85	0,62	0,80	1,08
sema domain, transmembrane domain (TM), and cytoplasmic domain, (semaphorin) 6B	NM_020241	0,69	0,68	0,88	0,62	0,67	0,70
interferon regulatory factor 3	NM_001571	0,88	0,82	0,99	0,63	0,69	0,79
solute carrier family 39 (zinc transporter), member 14	D31887	0,74	0,66	0,81	0,63	0,68	0,89
proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 12	AI446530	0,69	0,77	0,88	0,63	0,69	0,73
malic enzyme 2, NAD(+)-dependent, mitochondrial	BC000147	0,70	1,07	0,91	0,63	0,72	1,11
mitochondrial ribosomal protein L17	AK026857	0,83	0,81	1,03	0,63	0,79	0,77
aminomethyltransferase (glycine cleavage system protein T)	NM_000481	0,90	0,88	0,95	0,63	0,68	0,83
poly (ADP-ribose) polymerase family, member 1	M32721	0,73	1,00	0,85	0,63	0,71	0,76
MpV17 transgene, murine homolog, glomerulosclerosis	NM_002437	0,81	0,73	0,97	0,63	0,67	0,74
hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 12	NM_016142	0,74	1,03	0,83	0,63	0,68	0,81
ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 6	AF308472	0,74	0,78	0,94	0,63	0,67	1,07
solute carrier family 37 (glycerol-6-phosphate transporter), member 4	NM_001467	0,71	0,88	0,92	0,63	0,67	1,22
lanosterol synthase (2,3-oxidosqualene-lanosterol cyclase)	AW084510	0,73	0,78	0,83	0,63	0,67	0,79
retinol dehydrogenase 11 (all-trans and 9-cis)	AL096716	0,99	1,14	0,79	0,63	0,74	0,94
N-acylsphingosine amidohydrolase (acid ceramidase)-like	AK024677	0,86	0,87	0,93	0,63	0,72	0,86
COP9 constitutive photomorphogenic homolog subunit 7A (Arabidopsis)	AF193844	0,78	0,81	0,89	0,63	0,71	0,82
annexin A7	NM_004034	0,96	0,76	0,90	0,63	0,74	0,91
DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 39	NM_005804	0,72	0,97	0,91	0,63	0,68	0,79
tubulin, gamma 1	NM_001070	0,68	0,74	0,93	0,64	0,73	0,73
F-box protein 5	NM_012177	0,88	1,11	0,93	0,64	0,74	0,89
dudulin 2	NM_018234	1,01	0,90	0,95	0,64	0,71	0,86
squalene epoxidase	AF098865	0,76	0,98	0,80	0,64	0,67	0,90
solute carrier family 35 (UDP-N-acetylglucosamine (UDP-GlcNAc) transporter), member A3	NM_012243	0,99	0,88	0,87	0,64	0,78	1,00
nipsnap homolog 1 (C. elegans)	AW083371	0,70	0,79	0,84	0,64	0,71	0,92
FLJ23311 protein	NM_024680	0,83	1,03	0,88	0,64	0,76	0,78
NIMA (never in mitosis gene a)-related kinase 7	AL080111	1,63	0,98	0,78	0,64	0,67	1,39
deoxyhypusine synthase	NM_001930	0,87	0,99	1,00	0,64	0,74	0,96
asparagine-linked glycosylation 5 homolog (yeast, dolichyl-phosphate beta-glucosyltransferase)	NM_013338	0,56	0,91	0,81	0,64	0,68	0,70
dynamitin 1	AF035321	1,26	0,88	0,93	0,64	0,69	0,83
hypothetical protein FLJ11273	AV705186	0,82	1,17	0,70	0,64	0,70	0,80
coatamer protein complex, subunit zeta 1	NM_016057	0,84	0,54	0,80	0,64	0,71	0,75

Die Genexpression ist als x-fache Veränderung im Vergleich zu unbehandelten Zellen angegeben



### Fortsetzung Tabelle K: Gene, spezifisch durch IGF1R reguliert

Gen	'gene bank accession no.'	IGF-II ds1	IGF-II ds3	INSR ds1	IGF1R ds3	Rez. Mix	nonsense siRNA
WD repeat domain 18	BC001648	0,83	0,87	0,89	0,64	0,68	0,83
dynactin 4 (p62)	NM_016221	0,75	1,01	0,96	0,65	0,75	0,91
chromosome 20 open reading frame 172	NM_024918	0,75	1,01	0,85	0,65	0,77	0,74
signal recognition particle 72kDa	NM_001222	0,72	0,66	0,88	0,65	0,71	0,69
hypothetical protein FLJ10407	NM_018087	0,78	0,84	0,98	0,65	0,80	0,69
Coenzyme A synthase	NM_025233	0,62	0,75	0,97	0,65	0,71	0,84
fatty acid desaturase 2	NM_004265	0,79	0,94	0,74	0,65	0,68	0,77
target of myb1-like 1 (chicken)	NM_005486	1,06	1,01	0,87	0,65	0,72	1,15
mannose phosphate isomerase	NM_002435	0,72	0,79	0,96	0,65	0,67	0,80
WD40 repeat protein Interacting with phosphoinositides of 49kDa	NM_017983	1,36	0,97	0,89	0,65	0,75	1,17
chromosome 9 open reading frame 76	NM_024945	0,56	1,07	0,91	0,65	0,75	0,90
MyoD family inhibitor domain containing /// MyoD family inhibitor domain containing	AF054589	0,95	0,94	0,88	0,65	0,72	0,94
CD164 antigen, sialomucin	NM_006016	1,14	1,00	0,85	0,65	0,68	0,75
cadherin 1, type 1, E-cadherin (epithelial)	NM_004360	1,10	0,70	0,96	0,65	0,76	0,95
glyoxylate reductase/hydroxypyruvate reductase	NM_012203	0,80	0,89	0,97	0,65	0,67	0,96
nitrilase 1	NM_005600	0,79	0,71	0,91	0,65	0,68	0,73
epithelial V-like antigen 1	NM_005797	0,74	0,55	0,87	0,65	0,73	0,76
nucleolar protein 7, 27kDa	NM_016167	0,80	0,76	1,03	0,65	0,78	0,71
SFRS protein kinase 1	AW082913	0,82	0,94	1,02	0,66	0,70	0,73
glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1-like	AA135522	0,88	1,11	0,73	0,66	0,81	0,83
acyl-Coenzyme A dehydrogenase, short/branched chain	NM_001609	0,75	0,69	0,98	0,66	0,78	1,10
6-pyruvoyl-tetrahydropterin synthase/dimerization cofactor of hepatocyte nuclear factor 1 alpha (TCF1)	NM_000281	0,79	0,72	0,88	0,66	0,72	0,94
phosphofructokinase, liver	NM_002626	0,92	0,95	0,92	0,66	0,74	0,94
RAN binding protein 5	AF339834	0,65	0,78	0,88	0,66	0,71	0,75
cell division cycle associated 3 /// cell division cycle associated 3	NM_031299	0,87	0,82	0,95	0,66	0,83	0,88
nucleoporin 37kDa	NM_024057	0,72	0,74	0,89	0,66	0,71	0,69
methylcrotonoyl-Coenzyme A carboxylase 1 (alpha)	NM_020166	0,69	0,77	0,89	0,66	0,71	0,76
ubiquinol-cytochrome c reductase core protein I	NM_003365	0,86	0,95	0,89	0,66	0,71	0,98
protein disulfide isomerase-associated 6	NM_005742	0,73	0,86	0,87	0,66	0,77	0,69
lactamase, beta 2	NM_016027	0,85	0,87	0,86	0,66	0,77	1,19
sex comb on midleg-like 1 (Drosophila)	BF001786	0,70	0,72	0,92	0,66	0,73	0,82
ADP-ribosylation factor-like 1	BE890745	0,84	0,87	0,91	0,66	0,81	0,96
ilvB (bacterial acetolactate synthase)-like	NM_006844	0,83	1,01	0,92	0,66	0,74	0,89
glutathione S-transferase kappa 1	NM_015917	0,94	0,74	0,91	0,66	0,71	0,90
5'-nucleotidase, ecto (CD73)	NM_002526	1,00	0,66	1,12	0,66	0,77	0,96
inhibitor of DNA binding 4, dominant negative helix-loop-helix protein	AW157094	0,61	0,90	0,86	0,66	0,80	0,70

Die Genexpression ist als x-fache Veränderung im Vergleich zu unbehandelten Zellen angegeben



### Fortsetzung Tabelle K: Gene, spezifisch durch IGF1R reguliert

Gen	'gene bank accession no.'	IGF-II ds1	IGF-II ds3	INSR ds1	IGF1R ds3	Rez. Mix	nonsense siRNA
Insulin-like growth factor 1 receptor	AI830698	1,04	1,09	0,86	0,66	0,67	0,86
FLJ20298 protein	NM_017752	0,87	0,89	0,89	0,66	0,79	0,81
AHNAK nucleoprotein (desmoyokin)	BG287862	1,31	0,93	0,88	0,66	0,74	1,32
cysteine conjugate-beta lyase; cytoplasmic (glutamine transaminase K, kyneurenine aminotransferase)	NM_004059	1,10	0,91	0,93	0,66	0,73	0,81
dehydrogenase/reductase (SDR family) member 1	AL050217	1,00	0,71	0,93	0,66	0,74	1,12
myosin VC	NM_018728	0,96	1,18	0,94	0,66	0,74	1,41
lamin B receptor	NM_002296	0,82	1,14	0,82	0,66	0,73	0,87
dolichyl-phosphate (UDP-N-acetylglucosamine) N-acetylglucosaminephosphotransferase 1 (GlcNAc-1-P transferase)	BC000325	0,84	0,89	0,92	0,66	0,71	0,72
sterol O-acyltransferase 2	AF059203	0,71	0,53	1,17	0,67	0,74	1,26
B9 protein	NM_015681	0,77	0,81	1,01	0,67	0,72	0,78
mitochondrial ribosomal protein L39	NM_017446	0,75	0,54	0,96	0,67	0,78	0,79
chromosome 14 open reading frame 139	NM_024633	1,00	0,70	0,95	0,67	0,73	0,97
cadherin, EGF LAG seven-pass G-type receptor 3 (flamingo homolog, Drosophila)	NM_001407	1,19	1,27	1,04	1,50	1,37	1,18
CCR4-NOT transcription complex, subunit 8	AF180476	1,18	1,31	0,97	1,50	1,30	1,17
KIAA0350 protein	AA731693	1,16	1,04	1,00	1,50	1,31	1,17
TRAF2 and NCK interacting kinase	AF172268	1,42	1,27	1,00	1,50	1,25	0,89
lysosomal-associated membrane protein 1	NM_005561	0,94	1,04	1,02	1,51	1,30	1,00
hypothetical protein MGC8974	AL031427	1,31	1,23	0,97	1,51	1,31	1,11
hypothetical protein FLJ14166	NM_024565	1,38	1,48	0,89	1,51	1,18	1,03
protocadherin beta 8	NM_019120	1,12	1,18	1,01	1,51	1,37	0,94
epiplakin 1 /// epiplakin 1	NM_031308	1,07	1,13	0,96	1,51	1,17	1,23
putative translation initiation factor	AF083441	1,01	1,08	1,05	1,51	1,46	1,04
ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 7	NM_020354	1,05	0,95	0,99	1,51	1,26	0,99
transcription factor 12 (HTF4, helix-loop-helix transcription factors 4)	AL559478	1,14	1,20	0,88	1,51	1,33	1,15
Mouse Mammary Tumor Virus Receptor homolog 1	BF974389	1,17	1,35	0,98	1,51	1,28	1,30
sirtuin (silent mating type information regulation 2 homolog) 1 (S. cerevisiae)	NM_012238	1,12	1,50	0,92	1,51	1,26	1,33
transmembrane protein with EGF-like and two follistatin-like domains 1	BF439316	1,30	1,89	1,01	1,51	1,10	1,15
TNFAIP3 interacting protein 1	NM_006058	1,13	0,89	0,97	1,51	1,29	1,20
suppressor of hairy wing homolog 1 (Drosophila)	AA558468	1,26	1,16	1,16	1,52	1,27	1,06
thyroid hormone receptor interactor 3	AI131008	1,03	1,09	0,89	1,52	1,26	1,10
KIAA0515	AB011087	0,98	1,19	0,93	1,52	1,42	1,14
single-stranded DNA binding protein 2	NM_012446	1,42	1,68	1,00	1,52	1,25	1,01
tubby like protein 4	NM_020245	1,21	1,42	0,94	1,52	1,28	1,15
KIAA0495	AI073551	1,07	1,30	1,02	1,52	1,45	1,43
P antigen family, member 1 (prostate associated)	NM_003785	1,01	1,02	1,03	1,53	1,19	0,91

Die Genexpression ist als x-fache Veränderung im Vergleich zu unbehandelten Zellen angegeben



Fortsetzung Tabelle K: Gene, spezifisch durch IGF1R reguliert

Gen	'gene bank accession no.'	IGF-II ds1	IGF-II ds3	INSR ds1	IGF1R ds3	Rez. Mix	nonsense siRNA
cell division cycle 2-like 6 (CDK8-like) /// cell division cycle 2-like 6 (CDK8-like)	AY028424	1,12	1,43	0,92	1,53	1,38	1,24
RNA binding motif protein 30	BC003503	1,04	1,06	0,94	1,53	1,26	0,88
ribosomal protein L22	D17652	0,77	0,93	0,95	1,53	1,32	1,43
eukaryotic translation initiation factor 2C, 3	NM_024852	1,13	1,02	1,03	1,53	1,41	0,97
calpain 2, (m/II) large subunit	M23254	5,17	1,19	1,11	1,53	1,27	1,17
RING1 and YY1 binding protein	AB029551	1,36	1,44	0,92	1,53	1,35	1,13
HMG-box transcription factor 1	NM_012257	1,09	1,24	1,01	1,53	1,33	1,20
zinc finger protein 277	AK027128	0,94	1,12	0,88	1,53	1,32	1,16
brain-derived neurotrophic factor	NM_001709	1,27	1,97	1,11	1,53	1,41	1,07
KIAA0423	AI823592	1,04	1,14	1,08	1,53	1,41	1,32
programmed cell death 6 interacting protein	NM_013374	1,24	1,14	0,95	1,53	1,48	1,15
nuclear prelamin A recognition factor	NM_012336	1,12	1,26	0,99	1,54	1,46	0,85
UDP-glucuronate decarboxylase 1	NM_025076	1,78	1,11	0,95	1,54	1,26	1,26
makorin, ring finger protein, 1 /// makorin, ring finger protein, 1	NM_013446	1,10	1,00	0,88	1,54	1,40	1,31
poly (ADP-ribose) polymerase family, member 8	NM_024615	1,12	1,40	1,07	1,54	1,35	1,28
hypothetical protein MGC4504	NM_024111	1,18	1,09	1,03	1,55	1,24	1,05
myosin head domain containing 1	NM_025109	1,04	1,03	1,14	1,55	1,46	1,18
cysteine-rich hydrophobic domain 2	NM_012110	1,10	1,23	0,90	1,55	1,40	0,99
protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 12	NM_002835	1,36	1,17	1,01	1,55	1,32	1,22
BMP and activin membrane-bound inhibitor	NM_012342	1,01	1,95	0,85	1,55	1,49	1,19
transmembrane protein 45A	NM_018004	1,88	1,25	0,93	1,55	1,39	0,95
WD repeat domain 1	NM_017491	1,47	1,26	0,96	1,55	1,40	1,01
family with sequence similarity 38, member B	AW269818	1,38	1,56	0,95	1,56	1,45	1,48
suppressor of variegation 4-20 homolog 1 (Drosophila)	AA056099	1,13	1,28	0,85	1,56	1,46	1,10
RWD domain containing 3	NM_015485	1,45	1,35	0,98	1,56	1,41	1,33
ring finger and KH domain containing 2	NM_016626	1,31	1,68	0,93	1,56	1,21	1,25
neogenin homolog 1 (chicken)	NM_002499	0,99	1,50	0,94	1,56	1,16	1,08
histidyl-tRNA synthetase-like	U18937	1,07	1,07	1,00	1,56	1,35	1,01
zinc finger protein 134 (clone pHZ-15)	NM_003435	1,26	1,13	0,99	1,56	1,28	0,90
ring finger protein 111	NM_017610	1,24	1,16	0,97	1,56	1,39	1,14
farnesyltransferase, CAAX box, alpha /// farnesyltransferase, CAAX box, alpha	BG168896	1,09	0,98	1,00	1,57	1,44	1,10
armadillo repeat containing, X-linked 1	NM_016608	1,10	1,65	0,98	1,57	1,27	1,27
folliculin-like 1	BC000055	1,49	2,01	1,00	1,57	1,24	1,42
MAX interactor 1 /// MAX interactor 1	NM_005962	1,03	1,42	1,00	1,57	1,35	1,11
KIAA0753 gene product	NM_014804	0,99	1,15	1,07	1,57	1,37	1,23
G protein-coupled receptor, family C, group 5, member C	NM_022036	1,16	1,16	0,92	1,57	1,37	1,37

Die Genexpression ist als x-fache Veränderung im Vergleich zu unbehandelten Zellen angegeben



### Fortsetzung Tabelle K: Gene, spezifisch durch IGF1R reguliert

Gen	'gene bank accession no.'	IGF-II ds1	IGF-II ds3	INSR ds1	IGF1R ds3	Rez. Mix	nonsense siRNA
G patch domain containing 2	NM_018040	1,11	1,00	1,12	1,58	1,47	1,01
coactosin-like 1 (Dictyostelium)	NM_021615	2,22	1,29	1,07	1,58	1,27	0,95
SEC11-like 1 (S. cerevisiae)	NM_014300	0,90	1,21	0,88	1,58	1,36	0,88
Paraspeckle component 1	AL049263	1,19	1,18	1,00	1,58	1,48	1,12
T-cell immunomodulatory protein /// T-cell immunomodulatory protein	NM_030790	1,43	1,48	1,00	1,58	1,44	1,23
retinoic acid induced 17	AF070622	1,20	1,43	0,89	1,58	1,45	1,31
platelet-activating factor acetylhydrolase, isoform Ib, gamma subunit 29kDa	NM_002573	1,13	1,67	1,06	1,58	1,38	1,16
ankyrin repeat domain 12	AW572909	1,17	1,08	1,01	1,58	1,36	1,14
guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha inhibiting activity polypeptide 1	AL049933	1,32	1,64	0,92	1,59	1,42	1,00
centrosome spindle pole associated protein	NM_024790	1,26	1,56	0,98	1,59	1,44	1,19
Disabled homolog 2, mitogen-responsive phosphoprotein (Drosophila)	N21202	1,57	1,25	0,97	1,59	1,36	1,05
guanylate binding protein 2, interferon-inducible /// guanylate binding protein 2, interferon-inducible	NM_004120	1,18	0,99	0,93	1,60	1,44	0,86
myo-inositol monophosphatase A3	NM_017813	1,16	0,89	0,97	1,60	1,33	1,13
chromosome 10 open reading frame 38	AU150943	1,13	1,69	0,92	1,60	1,29	0,90
DRE1 protein	NM_017644	1,04	1,07	1,08	1,60	1,25	1,07
zinc finger protein 435	NM_025231	1,23	1,47	0,98	1,60	1,34	1,00
RAB17, member RAS oncogene family	NM_022449	1,15	0,98	1,05	1,60	1,46	1,42
killer cell lectin-like receptor subfamily C, member 3	NM_002261	0,98	0,73	1,03	1,60	1,29	0,94
motile sperm domain containing 1	NM_019556	1,86	1,31	0,89	1,61	1,36	1,23
bone morphogenetic protein 1	NM_006129	1,42	1,21	1,00	1,61	1,46	1,16
Yes-associated protein 1, 65kDa	A1745185	1,35	1,00	0,96	1,61	1,35	0,91
collagen, type IV, alpha 5 (Alport syndrome)	AW052179	1,44	1,74	0,93	1,61	1,49	0,99
reticulocalbin 2, EF-hand calcium binding domain	BC004892	0,91	1,41	0,86	1,61	1,33	1,15
cyclin B1 interacting protein 1	NM_021178	1,08	0,84	0,94	1,61	1,21	1,16
very low density lipoprotein receptor	L22431	1,74	1,09	1,17	1,61	1,24	1,10
actin, gamma 2, smooth muscle, enteric	NM_001615	1,19	1,74	1,01	1,61	1,26	1,06
dehydrogenase/reductase (SDR family) member 3	NM_004753	0,98	0,86	0,95	1,61	1,39	1,35
internexin neuronal intermediate filament protein, alpha	NM_004692	1,11	1,28	1,05	1,62	1,31	1,04
grancalcin, EF-hand calcium binding protein /// grancalcin, EF-hand calcium binding protein	NM_012198	0,94	1,59	0,86	1,62	1,28	1,35
SH3 domain binding glutamic acid-rich protein like 3 /// SH3 domain binding glutamic acid-rich protein like 3	NM_031286	1,84	1,14	0,86	1,62	1,44	1,06
protein kinase (cAMP-dependent, catalytic) inhibitor alpha	NM_006823	1,21	2,47	0,77	1,62	1,31	1,29
prolactin	NM_000948	1,24	1,46	1,16	1,62	1,43	1,01
zinc finger protein 426	NM_024106	1,18	1,12	0,94	1,62	1,38	0,80
hypothetical protein FLJ13710	BG163478	1,37	1,18	1,12	1,63	1,41	1,08
RAB33B, member RAS oncogene family /// RAB33B, member RAS oncogene family	NM_031296	1,06	1,28	0,95	1,63	1,33	1,27

Die Genexpression ist als x-fache Veränderung im Vergleich zu unbehandelten Zellen angegeben





### Fortsetzung Tabelle K: Gene, spezifisch durch IGF1R reguliert

Gen	'gene bank accession no.'	IGF-II ds1	IGF-II ds3	INSR ds1	IGF1R ds3	Rez. Mix	nonsense siRNA
KIAA0831	NM_014924	1,31	1,07	0,96	1,63	1,33	1,14
growth factor receptor-bound protein 10	D86962	1,23	1,48	0,91	1,64	1,31	1,12
thymosin-like 8	NM_021992	1,09	2,34	1,05	1,65	1,33	1,25
cofactor required for Sp1 transcriptional activation, subunit 6, 77kDa	AF105421	1,21	1,30	1,01	1,65	1,44	1,16
bromodomain adjacent to zinc finger domain, 2B	NM_013450	1,36	1,47	1,06	1,65	1,42	1,23
pogo transposable element with ZNF domain	AB007930	1,16	1,45	0,97	1,65	1,46	1,18
SH3-domain binding protein 4	AF015043	1,42	1,42	0,93	1,66	1,38	1,41
zinc finger protein 140 (clone pHZ-39)	NM_003440	1,22	1,26	0,97	1,66	1,30	0,99
actin, alpha, cardiac muscle	NM_005159	1,17	2,10	1,00	1,67	1,34	1,07
enabled homolog (Drosophila)	NM_018212	1,39	1,44	0,86	1,68	1,45	1,14
AT rich interactive domain 4B (RBP1- like) /// AT rich interactive domain 4B (RBP1- like)	NM_016374	1,26	1,54	0,93	1,68	1,49	1,09
solute carrier family 39 (zinc transporter), member 6	AI635449	1,26	1,36	1,04	1,68	1,45	1,06
trophoblast glycoprotein	NM_006670	1,65	1,41	0,93	1,68	1,34	1,48
unc-51-like kinase 1 (C. elegans)	AB018265	1,28	1,64	0,94	1,69	1,46	1,21
zinc finger protein 74 (Cos52)	NM_003426	1,20	1,36	0,95	1,70	1,38	1,33
glycoprotein (transmembrane) nmb	NM_002510	0,96	0,87	0,97	1,70	1,28	0,81
tumor protein p53 binding protein, 2	NM_005426	1,30	1,47	0,99	1,70	1,36	1,45
zinc finger protein 274	NM_016325	1,38	1,24	0,96	1,70	1,38	1,01
solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; adenine nucleotide translocator), member 6	AA916851	0,92	1,23	0,96	1,70	1,38	1,00
granzyme K (serine protease, granzyme 3; tryptase II)	NM_002104	1,03	0,91	1,08	1,71	1,44	0,97
sodium channel, voltage-gated, type IX, alpha	NM_002977	1,65	1,36	1,00	1,71	1,48	1,29
solute carrier family 38, member 2	NM_018573	1,23	1,26	0,92	1,72	1,46	1,06
related RAS viral (r-ras) oncogene homolog 2	NM_012250	1,41	1,06	0,92	1,72	1,44	1,11
phosphoglycerate dehydrogenase	NM_006623	0,68	1,38	0,87	1,73	1,46	0,85
heme oxygenase (decycling) 1	NM_002133	0,94	0,70	0,89	1,74	1,17	1,13
TPA-induced transmembrane protein	NM_024616	1,54	1,25	0,84	1,74	1,16	1,28
G protein-coupled receptor 37 (endothelin receptor type B-like)	U87460	1,39	1,33	1,06	1,74	1,49	1,09
sema domain, immunoglobulin domain (Ig), short basic domain, secreted, (semaphorin) 3C	AI962897	1,69	1,08	1,08	1,76	1,32	1,08
neuronal cell adhesion molecule	NM_005010	1,28	1,85	1,01	1,77	1,46	1,22
Rho family GTPase 1	U69563	1,74	1,16	0,97	1,77	1,43	1,02
activating transcription factor 3	NM_001674	1,46	1,23	1,00	1,79	1,19	1,25
protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 15A	NM_014330	1,31	1,42	0,96	1,80	1,37	1,17
DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box polypeptide 40	BF431360	0,65	1,33	0,80	1,81	1,46	1,28
tissue inhibitor of metalloproteinase 2	NM_003255	2,24	1,49	1,09	1,83	1,46	1,13
H2A histone family, member Y2	NM_018649	1,21	1,38	0,99	1,83	1,49	1,07

Die Genexpression ist als x-fache Veränderung im Vergleich zu unbehandelten Zellen angegeben

**Fortsetzung Tabelle K: Gene, spezifisch durch IGF1R reguliert**

Gen	'gene bank accession no.'	IGF-II ds1	IGF-II ds3	INSR ds1	IGF1R ds3	Rez. Mix	nonsense siRNA
nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 4	NM_019094	0,85	1,31	0,99	1,83	1,47	1,11
protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 12B	AF324888	1,14	1,06	1,03	1,84	1,42	1,18
Ras-like without CAAX 1	AF084462	1,45	1,17	1,02	1,84	1,45	1,00
zinc finger protein 85 (HPF4, HTF1)	NM_003429	1,49	1,67	0,88	1,85	1,45	0,97
ectodermal-neural cortex (with BTB-like domain)	AF010314	1,46	1,40	0,93	1,85	1,45	1,23
Cyclin G2	AW134535	1,23	1,93	0,90	1,91	1,42	1,44
zyxin	NM_003461	1,83	1,17	0,84	1,93	1,46	1,40
vesicle amine transport protein 1 homolog (T californica)	BC001913	1,76	1,45	0,99	1,93	1,47	1,25
chimerin (chimaerin) 1	BF339445	1,19	2,17	0,92	2,01	1,46	1,06
Ras-related GTP binding C	AK023373	1,14	1,15	0,97	2,03	1,43	1,40

**Tabelle L: Gene, spezifisch durch INSR reguliert**

Gen	'gene bank accession no.'	IGF-II ds1	IGF-II ds3	INSR ds1	IGF1R ds3	Rez. Mix	nonsense siRNA
serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade G (C1 inhibitor), member 1, (angioedema, hereditary)	NM_000062	0,50	1,23	0,54	0,85	0,89	1,04
paraoxonase 2	NM_000305	1,01	1,00	0,54	0,92	0,72	1,15
protein tyrosine phosphatase, receptor type, K	NM_002844	1,27	1,12	0,55	1,44	0,99	1,14
centrin, EF-hand protein, 2	BC005334	0,57	0,81	0,55	0,98	0,79	0,80
mesoderm specific transcript homolog (mouse)	NM_002402	1,32	1,55	0,59	1,05	0,83	1,09
tumor differentially expressed 1 /// tumor differentially expressed 1	BC006088	0,99	0,83	0,60	0,80	0,67	0,98
liver-specific bHLH-Zip transcription factor	NM_015925	0,97	1,38	0,66	1,30	1,08	1,02

Die Genexpression ist als x-fache Veränderung im Vergleich zu unbehandelten Zellen angegeben



Tabelle M: Gene, spezifisch durch IGF-II reguliert

Gen	'gene bank accession no.'	IGF-II ds1	IGF-II ds3	INSR ds1	IGF1R ds3	Rez. Mix	nonsense siRNA
chemokine (C-C motif) ligand 20	NM_004591	0,28	0,34	1,06	0,85	0,96	1,15
complement component 5	NM_001735	0,41	0,44	0,83	0,88	0,96	0,69
inter-alpha (globulin) inhibitor H2	NM_002216	0,41	0,57	0,76	0,82	0,93	0,72
alpha-2-macroglobulin	NM_000014	0,54	0,48	0,76	0,79	0,80	0,89
serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade A (alpha-1 antiproteinase, antitrypsin), member 6	NM_001756	0,54	0,49	0,75	0,86	0,87	0,72
gap junction protein, beta 1, 32kDa (connexin 32, Charcot-Marie-Tooth neuropathy, X-linked)	NM_000166	0,54	0,53	0,91	0,70	0,85	1,04
WD repeat domain 6	NM_018031	0,55	1,56	0,92	0,99	1,00	1,15
CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), beta	AL564683	0,55	0,60	0,83	0,96	0,83	0,68
hypothetical protein FLJ11286	NM_018381	0,56	0,61	0,86	0,70	0,78	0,93
peroxisomal membrane protein 2, 22kDa	NM_018663	0,57	0,60	0,85	0,74	0,75	0,78
apolipoprotein M	NM_019101	0,59	0,44	0,89	0,75	0,89	0,69
sulfotransferase family, cytosolic, 2A, dehydroepiandrosterone (DHEA)-preferring, member 1	NM_003167	0,59	0,46	1,15	0,70	0,91	1,03
SH3 domain and tetratricopeptide repeats 1	NM_018986	0,61	0,59	0,84	0,78	0,86	0,96
growth and transformation-dependent protein	NM_014367	0,62	0,58	1,03	0,72	0,88	1,02
asialoglycoprotein receptor 2	NM_001181	0,62	0,66	0,77	0,69	0,75	0,78
nuclear receptor subfamily 0, group B, member 2	NM_021969	0,63	0,63	0,84	1,07	1,01	0,82
dopa decarboxylase (aromatic L-amino acid decarboxylase)	NM_000790	0,63	0,36	1,10	0,69	0,83	1,22
solute carrier family 35 (UDP-glucuronic acid/UDP-N-acetylgalactosamine dual transporter), member D1	N80922	0,63	0,67	0,79	0,73	0,82	0,97
plasminogen	M74220	0,64	0,59	0,86	0,78	0,98	0,80
cytochrome b-5	NM_001914	0,66	0,51	0,79	0,75	0,93	0,84
chromosome 12 open reading frame 22 /// chromosome 12 open reading frame 22	NM_030809	1,51	1,81	0,90	1,27	1,08	1,29
ribonuclease T2	NM_003730	1,51	1,85	0,88	0,92	0,93	1,48
galactosylceramidase (Krabbe disease)	NM_000153	1,54	1,56	1,07	1,42	1,28	1,26
FAT tumor suppressor homolog 4 (Drosophila)	NM_024582	1,57	1,55	1,08	1,39	1,44	1,16
lupus brain antigen 1	AA035414	1,59	1,56	1,14	0,96	0,98	1,15
hypothetical protein FLJ20366	NM_017786	1,67	1,70	1,00	1,49	1,34	1,32
bone morphogenetic protein 4	D30751	1,67	1,55	0,94	1,18	1,16	1,14
glutathione S-transferase M3 (brain)	AL527430	1,68	1,67	0,84	1,37	1,33	1,39
synuclein, alpha interacting protein (synphilin)	NM_005460	1,68	2,65	0,96	1,33	1,16	1,00
special AT-rich sequence binding protein 1 (binds to nuclear matrix/scaffold-associating DNA's)	NM_002971	1,71	2,66	0,99	1,40	1,30	0,89

Die Genexpression ist als x-fache Veränderung im Vergleich zu unbehandelten Zellen angegeben

**Fortsetzung Tabelle M: Gene, spezifisch durch IGF-II reguliert**

Gen	'gene bank accession no.'	IGF-II ds1	IGF-II ds3	INSR ds1	IGF1R ds3	Rez. Mix	nonsense siRNA
KIAA0882 protein	AI348094	1,82	1,60	1,01	1,39	1,36	1,21
vimentin	AI922599	1,85	2,02	0,80	1,22	1,18	1,42
coagulation factor II (thrombin) receptor	NM_001992	1,85	1,50	0,92	1,23	1,12	1,17
leprecan-like 1	NM_018192	1,89	2,48	0,86	0,92	1,15	0,99
tumor necrosis factor, alpha-induced protein 8	NM_014350	2,02	1,99	0,95	1,14	1,12	1,36
EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1	AI826799	2,10	2,43	1,07	0,87	0,99	1,02
proprotein convertase subtilisin/kexin type 5	NM_006200	2,15	1,52	0,88	1,30	1,02	1,24
immunoglobulin superfamily, member 4	NM_014333	2,16	2,43	0,95	1,41	1,12	1,29
ADP-ribosylation factor-like 7	AW450363	2,19	3,02	1,08	1,16	1,13	1,21
dickkopf homolog 3 (Xenopus laevis)	NM_013253	2,75	1,62	0,90	0,99	0,89	1,47

**Tabelle N: Gene, spezifisch durch Rez. Mix reguliert**

Gen	'gene bank accession no.'	IGF-II ds1	IGF-II ds3	INSR ds1	IGF1R ds3	Rez. Mix	nonsense siRNA
lipase A, lysosomal acid, cholesterol esterase (Wolman disease)	NM_000235	1,08	0,98	0,83	0,69	0,62	0,89
radical S-adenosyl methionine domain containing 1	NM_018346	0,66	0,76	0,90	0,67	0,64	0,70
chromosome 6 open reading frame 48	NM_016947	0,73	0,86	0,97	0,69	0,64	0,87
cyclin J	NM_019084	0,93	1,48	0,86	0,67	0,65	1,14
FERM, RhoGEF (ARHGEF) and pleckstrin domain protein 1 (chondrocyte-derived)	BF213279	1,32	1,45	0,73	0,76	0,65	1,17
proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 8	NM_002812	0,87	0,80	0,91	0,69	0,66	0,71
carboxypeptidase B2 (plasma, carboxypeptidase U)	NM_016413	0,44	0,83	1,03	1,33	1,50	0,67
coagulation factor XIII, B polypeptide	NM_001994	0,79	0,59	1,12	1,34	1,61	0,73
insulin-like growth factor binding protein 1	NM_000596	0,87	0,98	0,99	1,23	1,74	0,82
potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 8	BF514158	1,16	1,85	1,11	1,48	1,74	1,16

Die Genexpression ist als x-fache Veränderung im Vergleich zu unbehandelten Zellen angegeben

Tabelle O: regulierte Gene funktioneller Prozesse

Gen	Gensymbol	'gene bank accession no.'	Genontology Biological Process	IGF-II ds1	IGF-II ds3	INSR ds1	IGF1R ds3	Rez. Mix	nonsense siRNA
<b>durch IGF1R-Inhibierung reguliert</b>									
synaptobrevin-like 1	SYBL1	NM_005638	6355 // regulation of transcription, DNA-dependent	0,95	0,82	0,92	0,3219	0,45	0,95
mutS homolog 2, colon cancer, nonpolyposis type 1 (E. coli)	MSH2	U04045	6298 // mismatch repair	0,88	1,03	0,91	0,3281	0,39	0,87
alanyl-tRNA synthetase	AARS	NM_001605	6412 // protein biosynthesis	0,64	0,83	1,00	0,3460	0,40	0,72
pyruvate dehydrogenase complex, component X	PDHX	NM_003477	8152 // metabolism	0,86	0,62	0,91	0,4246	0,56	0,83
TAF12 RNA polymerase II, TATA box binding protein (TBP)-associated factor, 20kDa	TAF12	D50544	6350 // transcription	0,86	0,82	1,00	0,4554	0,51	0,79
v-myb myeloblastosis viral oncogene homolog (avian)-like 2	MYBL2	NM_002466	74 // regulation of cell cycle	0,72	1,07	0,85	0,4667	0,59	0,88
polymerase (DNA directed), epsilon 3 (p17 subunit)	POLE3	BC004170	6260 // DNA replication	0,64	0,77	0,86	0,4940	0,64	0,76
mitochondrial ribosomal protein L9	MRPL9	BC004517	6412 // protein biosynthesis	0,92	0,98	0,87	0,4977	0,53	0,85
E-1 enzyme	MASA	NM_021204	8152 // metabolism	0,76	0,78	0,91	0,5059	0,63	0,82
antigen identified by monoclonal antibody Ki-67	MKI67	AU152107	74 // regulation of cell cycle	0,71	0,89	0,95	0,5178	0,68	0,79
septin 10	SEPT10	BF966021	7049 // cell cycle	0,96	1,09	0,81	0,5305	0,54	0,83
cyclin-dependent kinase inhibitor 3 (CDK2-associated dual specificity phosphatase)	CDKN3	AF213033	79 // regulation of cyclin dependent protein kinase activity	0,96	0,85	0,93	0,5330	0,70	0,87
aprataxin	APTX	NM_017692	12 // single strand break repair	0,70	0,81	0,92	0,5412	0,58	0,87
primase, polypeptide 1, 49kDa	PRIM1	NM_000946	6260 // DNA replication	0,82	1,11	1,01	0,5479	0,71	0,76
DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 3 beta	DNMT3B	NM_006892	67 // DNA replication and chromosome cycle	0,84	0,93	0,96	0,5591	0,65	1,35
cyclin A2	CCNA2	NM_001237	79 // regulation of cyclin dependent protein kinase activity	0,81	0,73	0,89	0,5717	0,79	0,76
ribonuclease H2, large subunit	RNASEH2A	NM_006397	6260 // DNA replication	0,84	1,07	0,90	0,5719	0,65	0,75
enoyl Coenzyme A hydratase domain containing 3	ECHDC3	NM_024693	8152 // metabolism	0,58	0,79	0,91	0,5768	0,61	1,14
SLC2A4 regulator	SLC2A4RG	BE898559	6350 // transcription	0,64	0,68	0,74	0,5769	0,72	0,79
KIAA0664 protein	KIAA0664	AB014564	6412 // protein biosynthesis	0,67	0,65	1,00	0,5857	0,75	0,73
nuclear receptor subfamily 1, group H, member 3	NR1H3	NM_005693	6350 // transcription	0,68	0,61	0,93	0,5915	0,70	0,71
ligatin	LGTN	NM_006893	6413 // translational initiation	0,71	0,78	1,02	0,6027	0,68	0,73
carbonic reductase 4	CBR4	AL049442	8152 // metabolism	0,95	1,15	1,01	0,6063	0,79	0,97
phospholysine phosphohistidine inorganic pyrophosphate phosphatase	LHPP	NM_022126	8152 // metabolism	0,85	0,79	0,83	0,6094	0,65	0,92
nidogen (enactin)	NID	BF940043	7160 // cell-matrix adhesion	0,87	1,11	0,74	0,6116	0,75	0,89
zinc finger, MYND domain containing 11	ZMYND11	BE250417	122 // negative regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	1,22	1,39	0,97	0,6148	0,65	1,32
arylacetamide deacetylase (esterase)	AADAC	NM_001086	8152 // metabolism	0,67	0,71	1,08	0,6170	0,83	0,92
inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase A	ITPKA	NM_002220	7165 // signal transduction	0,74	0,65	1,00	0,6172	0,69	1,11
protein kinase, DNA-activated, catalytic polypeptide	PRKDC	U47077	6302 // double-strand break repair	0,73	0,94	0,94	0,6186	0,73	0,78
polymerase (DNA directed), epsilon 2 (p59 subunit)	POLE2	NM_002692	6260 // DNA replication	0,81	0,78	0,93	0,6195	0,73	0,83
origin recognition complex, subunit 3-like (yeast)	ORC3L	AF125507	6260 // DNA replication	0,92	0,83	0,93	0,6199	0,76	0,74

Die Genexpression ist als x-fache Veränderung im Vergleich zu unbehandelten Zellen angegeben

## Fortsetzung Tabelle O: regulierte Gene funktioneller Prozesse

Gen	Gensymbol	'gene bank accession no.'	Genontology Biological Process	IGF-II ds1	IGF-II ds3	INSR ds1	IGF1R ds3	Rez. Mix	nonsense siRNA
MCM6 minichromosome maintenance deficient 6 (MIS5 homolog, <i>S. pombe</i> ) ( <i>S. cerevisiae</i> )	MCM6	NM_005915	6260 // DNA replication	0,83	1,13	0,93	0,6222	0,78	0,86
1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase 5 (lysophosphatidic acid acyltransferase, epsilon)	AGPAT5	NM_018361	8152 // metabolism	0,95	0,94	0,98	0,62	0,69	0,87
anaphase promoting complex subunit 5 /// anaphase promoting complex subunit 5	ANAPC5	T33068	74 // regulation of cell cycle	0,76	0,88	0,93	0,6241	0,70	0,83
interferon regulatory factor 3	IRF3	NM_001571	6350 // transcription	0,88	0,82	0,99	0,6258	0,69	0,79
mitochondrial ribosomal protein L17	MRPL17	AK026857	6412 // protein biosynthesis	0,83	0,81	1,03	0,6283	0,79	0,77
poly (ADP-ribose) polymerase family, member 1	PARP1	M32721	6281 // DNA repair	0,73	1,00	0,85	0,6296	0,71	0,76
hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 12	HSD17B12	NM_016142	8152 // metabolism	0,74	1,03	0,83	0,6304	0,68	0,81
retinol dehydrogenase 11 (all-trans and 9-cis)	RDH11	AL096716	8152 // metabolism	0,99	1,14	0,79	0,6340	0,74	0,94
seryl-tRNA synthetase 2	SARS2	NM_017827	6412 // protein biosynthesis	0,86	0,87	0,94	0,6380	0,63	0,92
FLJ23311 protein	FLJ23311	NM_024680	74 // regulation of cell cycle	0,83	1,03	0,88	0,6412	0,76	0,78
deoxyhypusine synthase	DHPS	NM_001930	6412 // protein biosynthesis	0,87	0,99	1,00	0,6420	0,74	0,96
Coenzyme A synthase	COASY	NM_025233	9058 // biosynthesis	0,62	0,75	0,97	0,6474	0,71	0,84
cadherin 1, type 1, E-cadherin (epithelial)	CDH1	NM_004360	7155 // cell adhesion	1,10	0,70	0,96	0,6530	0,76	0,95
epithelial V-like antigen 1	EVA1	NM_005797	7155 // cell adhesion	0,74	0,55	0,87	0,6542	0,73	0,76
SFRS protein kinase 1	SRPK1	AW082913	74 // regulation of cell cycle	0,82	0,94	1,02	0,6552	0,70	0,73
sex comb on midleg-like 1 ( <i>Drosophila</i> )	SCML1	BF001786	6350 // transcription	0,70	0,72	0,92	0,6601	0,73	0,82
ADP-ribosylation factor-like 1	ARL1	BE890745	7264 // small GTPase mediated signal transduction	0,84	0,87	0,91	0,6609	0,81	0,96
inhibitor of DNA binding 4, dominant negative helix-loop-helix protein	ID4	AW157094	6357 // regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	0,61	0,90	0,86	0,6618	0,80	0,70
Insulin-like growth factor 1 receptor	IGF1R	AI830698	74 // regulation of cell cycle	1,04	1,09	0,86	0,6618	0,67	0,86
dehydrogenase/reductase (SDR family) member 1	DHRS1	AL050217	8152 // metabolism	1,00	0,71	0,93	0,66	0,74	1,12
cadherin, EGF LAG seven-pass G-type receptor 3 (flamingo homolog, <i>Drosophila</i> )	CELSR3	NM_001407	7155 // cell adhesion	1,19	1,27	1,04	1,5008	1,37	1,18
CCR4-NOT transcription complex, subunit 8	CNOT8	AF180476	6350 // transcription	1,18	1,31	0,97	1,5015	1,30	1,17
TRAF2 and NCK interacting kinase	TNIK	AF172268	6445 // regulation of translation	1,42	1,27	1,00	1,5026	1,25	0,89
hypothetical protein FLJ14166	FLJ14166	NM_024565	74 // regulation of cell cycle	1,38	1,48	0,89	1,5086	1,18	1,03
protocadherin beta 8	PCDHB8	NM_019120	7155 // cell adhesion	1,12	1,18	1,01	1,5086	1,37	0,94
putative translation initiation factor	SUI1	AF083441	6412 // protein biosynthesis	1,01	1,08	1,05	1,5091	1,46	1,04
transcription factor 12 (HTF4, helix-loop-helix transcription factors 4)	TCF12	AL559478	6350 // transcription	1,14	1,20	0,88	1,5109	1,33	1,15
hematopoietically expressed homeobox	HHEX	NM_001529	6355 // regulation of transcription, DNA-dependent	1,28	1,27	0,97	1,5117	1,55	1,17
suppressor of hairy wing homolog 1 ( <i>Drosophila</i> )	SUHW1	AA558468	6350 // transcription	1,26	1,16	1,16	1,5164	1,27	1,06
thyroid hormone receptor interactor 3	TRIP3	AI131008	6355 // regulation of transcription, DNA-dependent	1,03	1,09	0,89	1,5177	1,26	1,10
single-stranded DNA binding protein 2	SSBP2	NM_012446	45449 // regulation of transcription //	1,42	1,68	1,00	1,5193	1,25	1,01
tubby like protein 4	TULP4	NM_020245	6355 // regulation of transcription	1,21	1,42	0,94	1,5201	1,28	1,15
ribosomal protein L22	RPL22	D17652	6412 // protein biosynthesis	0,77	0,93	0,95	1,5279	1,32	1,43

Die Genexpression ist als x-fache Veränderung im Vergleich zu unbehandelten Zellen angegeben

## Fortsetzung Tabelle O: regulierte Gene funktioneller Prozesse

Gen	Gensymbol	'gene bank accession no.'	Genontology Biological Process	IGF-II ds1	IGF-II ds3	INSR ds1	IGF1R ds3	Rez. Mix	nonsense siRNA
eukaryotic translation initiation factor 2C, 3	EIF2C3	NM_024852	6412 // protein biosynthesis	1,13	1,02	1,03	1,5280	1,41	0,97
RING1 and YY1 binding protein	RYBP	AB029551	122 // negative regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	1,36	1,44	0,92	1,5296	1,35	1,13
HMG-box transcription factor 1	HBP1	NM_012257	6355 // regulation of transcription, DNA- dependent	1,09	1,24	1,01	1,5297	1,33	1,20
zinc finger protein 277	ZNF277	AK027128	6350 // transcription	0,94	1,12	0,88	1,5304	1,32	1,16
programmed cell death 6 interacting protein	PDCD6IP	NM_013374	6915 // apoptosis	1,24	1,14	0,95	1,5334	1,48	1,15
makorin, ring finger protein, 1 /// makorin, ring finger protein, 1	MKRN1	NM_013446	16567 // protein ubiquitination	1,10	1,00	0,88	1,5430	1,40	1,31
ring finger and KH domain containing 2	RKHD2	NM_016626	16567 // protein ubiquitination	1,31	1,68	0,93	1,5572	1,21	1,25
histidyl-tRNA synthetase-like	HARSL	U18937	6412 // protein biosynthesis	1,07	1,07	1,00	1,5606	1,35	1,01
zinc finger protein 134 (clone pHZ-15)	ZNF134	NM_003435	6350 // transcription	1,26	1,13	0,99	1,5614	1,28	0,90
ring finger protein 111	RNF111	NM_017610	16567 // protein ubiquitination	1,24	1,16	0,97	1,5626	1,39	1,14
farnesyltransferase, CAAX box, alpha /// farnesyltransferase, CAAX box, alpha	FNTA	BG168896	7179 // transforming growth factor beta receptor signaling pathway	1,09	0,98	1,00	1,5673	1,44	1,10
MAX interactor 1 /// MAX interactor 1	MXI1	NM_005962	6350 // transcription	1,03	1,42	1,00	1,5736	1,35	1,11
G protein-coupled receptor, family C, group 5, member C	GPRC5C	NM_022036	7165 // signal transduction	1,16	1,16	0,92	1,5745	1,37	1,37
T-cell immunomodulatory protein /// T-cell immunomodulatory protein	CDA08	NM_030790	7160 // cell-matrix adhesion	1,43	1,48	1,00	1,5826	1,44	1,23
retinoic acid induced 17	RAI17	AF070622	6350 // transcription	1,20	1,43	0,89	1,5830	1,45	1,31
guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha inhibiting activity polypeptide 1	GNAI1	AL049933	7165 // signal transduction	1,32	1,64	0,92	1,5865	1,42	1,00
Disabled homolog 2, mitogen-responsive phosphoprotein (Drosophila)	DAB2	N21202	8283 // cell proliferation	1,57	1,25	0,97	1,5895	1,36	1,05
zinc finger protein 435	ZNF435	NM_025231	6350 // transcription	1,23	1,47	0,98	1,6015	1,34	1,00
RAB17, member RAS oncogene family	RAB17	NM_022449	7264 // small GTPase mediated signal transduction	1,15	0,98	1,05	1,6032	1,46	1,42
cyclin B1 interacting protein 1	CCNB1IP1	NM_021178	6512 // ubiquitin cycle	1,08	0,84	0,94	1,6096	1,21	1,16
Desmoglein 2	DSG2	NM_001943	7155 // cell adhesion	2,12	1,66	0,93	1,6191	1,42	1,43
zinc finger protein 426	ZNF426	NM_024106	6350 // transcription	1,18	1,12	0,94	1,6236	1,38	0,80
RAB33B, member RAS oncogene family /// RAB33B, member RAS oncogene family	RAB33B	NM_031296	7264 // small GTPase mediated signal transduction	1,06	1,28	0,95	1,6300	1,33	1,27
fibronectin leucine rich transmembrane protein 2	FLRT2	NM_013231	7155 // cell adhesion	1,41	1,85	1,00	1,6472	1,57	0,92
cofactor required for Sp1 transcriptional activation, subunit 6, 77kDa	CRSP6	AF105421	6350 // transcription	1,21	1,30	1,01	1,6489	1,44	1,16
Rho-related BTB domain containing 1	RHOBTB1	AB018283	7264 // small GTPase mediated signal transduction	1,86	1,85	0,94	1,6490	1,26	0,98
RNA binding motif, single stranded interacting protein 1	RBMS1	NM_016839	6260 // DNA replication	1,99	1,59	0,84	1,6493	1,47	1,42
bromodomain adjacent to zinc finger domain, 2B	BAZ2B	NM_013450	6350 // transcription	1,36	1,47	1,06	1,6514	1,42	1,23
zinc finger protein 140 (clone pHZ-39)	ZNF140	NM_003440	6350 // transcription	1,22	1,26	0,97	1,6640	1,30	0,99
son of sevenless homolog 1 (Drosophila)	SOS1	L13857	7265 // Ras protein signal transduction	1,31	1,26	1,07	1,6771	1,69	1,27
zinc finger protein 74 (Cos52)	ZNF74	NM_003426	6350 // transcription	1,20	1,36	0,95	1,6956	1,38	1,33

Die Genexpression ist als x-fache Veränderung im Vergleich zu unbehandelten Zellen angegeben

## Fortsetzung Tabelle O: regulierte Gene funktioneller Prozesse

Gen	Gensymbol	'gene bank accession no.'	Genontology Biological Process	IGF-II ds1	IGF-II ds3	INSR ds1	IGF1R ds3	Rez. Mix	nonsense siRNA
glycoprotein (transmembrane) nmb	GPNMB	NM_002510	8285 // negative regulation of cell proliferation	0,96	0,87	0,97	1,6969	1,28	0,81
tumor protein p53 binding protein, 2	TP53BP2	NM_005426	74 // regulation of cell cycle	1,30	1,47	0,99	1,6970	1,36	1,45
zinc finger protein 274	ZNF274	NM_016325	6350 // transcription	1,38	1,24	0,96	1,7017	1,38	1,01
SRB7 suppressor of RNA polymerase B homolog (yeast)	SURB7	AI688580	6350 // transcription	1,42	1,15	0,97	1,7213	1,50	1,04
Rap guanine nucleotide exchange factor (GEF) 2	RAPGEF2	BF439282	165 // MAPKKK cascade	1,33	1,22	0,98	1,7222	1,55	1,28
alpha thalassemia/mental retardation syndrome X-linked (RAD54 homolog, S. cerevisiae)	ATRAX	AI650257	6281 // DNA repair	1,35	1,48	0,90	1,7308	1,58	1,10
dickkopf homolog 1 (Xenopus laevis)	DKK1	NM_012242	7275 // development // 30178 // negative regulation of Wnt receptor signaling	1,61	2,19	1,33	1,7388	1,73	1,17
G protein-coupled receptor 37 (endothelin receptor type B-like)	GPR37	U87460	7165 // signal transduction	1,39	1,33	1,06	1,7409	1,49	1,09
cadherin 6, type 2, K-cadherin (fetal kidney)	CDH6	NM_004932	7155 // cell adhesion	1,93	2,12	1,09	1,7527	1,54	1,46
maternal G10 transcript	G10	NM_003910	6357 // regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	0,96	0,96	0,93	1,7529	1,51	1,07
tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (erythroid potentiating activity, collagenase inhibitor)	TIMP1	NM_003254	7275 // development	2,89	1,67	1,03	1,7536	1,45	1,40
activity-dependent neuroprotector	ADNP	NM_015339	6355 // regulation of transcription, DNA-dependent	1,19	1,46	0,94	1,7635	1,61	1,09
F-box protein 46	FBXO46	NM_012066	6512 // ubiquitin cycle	1,15	1,15	1,03	1,7761	1,54	1,03
granulin	GRN	NM_002087	7165 // signal transduction	1,35	1,40	0,92	1,7858	1,50	1,29
E74-like factor 3 (ets domain transcription factor, epithelial-specific )	ELF3	AF017307	6355 // regulation of transcription, DNA-dependent	1,45	1,13	0,88	1,7872	1,56	1,35
growth arrest and DNA-damage-inducible, beta	GADD45B	NM_015675	185 // activation of MAPKKK	1,68	1,19	1,04	1,7894	1,55	1,39
activating transcription factor 3	ATF3	NM_001674	6350 // transcription	1,46	1,23	1,00	1,7921	1,19	1,25
S100 calcium binding protein A6 (calcyclin)	S100A6	NM_014624	74 // regulation of cell cycle	4,26	1,02	0,91	1,7938	1,56	1,08
protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 15A	PPP1R15A	NM_014330	6915 // apoptosis / 7050 // cell cycle arrest / 6355 // regulation of transcription, DNA-dependent	1,31	1,42	0,96	1,7994	1,37	1,17
jumonji domain containing 1C	JMJD1C	AI694023	74 // regulation of cell cycle	1,15	1,23	0,88	1,8037	1,54	1,08
headcase homolog (Drosophila)	HECA	NM_016217	74 // regulation of cell cycle	1,51	1,55	0,96	1,8093	1,52	1,27
CDC-like kinase 1	CLK1	AI251890	74 // regulation of cell cycle	1,23	1,27	0,97	1,8367	1,54	1,13
Ras-like without CAAX 1	RIT1	AF084462	7165 // signal transduction	1,45	1,17	1,02	1,8379	1,45	1,00
protein kinase C binding protein 1	PRKCBP1	NM_018634	6355 // regulation of transcription, DNA-dependent	1,19	1,12	0,97	1,8405	1,69	0,81
zinc finger protein 85 (HPF4, HTF1)	ZNF85	NM_003429	6350 // transcription	1,49	1,67	0,88	1,8455	1,45	0,97
histone deacetylase 5	HDAC5	NM_005474	74 // regulation of cell cycle	0,98	1,04	1,06	1,8495	1,64	1,21
protocadherin 17	PCDH17	NM_014459	7155 // cell adhesion	1,57	2,29	0,98	1,8528	2,02	0,78
neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 9	NEDD9	AL136139	74 // regulation of cell cycle	1,60	1,42	1,03	1,8607	1,51	1,30
membrane-associated ring finger (C3HC4) 3	MARCH3	AW593996	16567 // protein ubiquitination	1,18	0,97	1,08	1,8684	1,56	1,23
Rho family GTPase 3	RND3	BG054844	7264 // small GTPase mediated signal transduction	1,88	1,57	1,04	1,8835	1,84	1,07
pre-B-cell leukemia transcription factor interacting protein 1	PBXIP1	NM_020524	16481 // negative regulation of transcription	1,44	1,37	0,96	1,8867	1,53	1,34

Die Genexpression ist als x-fache Veränderung im Vergleich zu unbehandelten Zellen angegeben



## Fortsetzung Tabelle O: regulierte Gene funktioneller Prozesse

Gen	Gensymbol	'gene bank accession no.'	Genontology Biological Process	IGF-II ds1	IGF-II ds3	INSR ds1	IGF1R ds3	Rez. Mix	nonsense siRNA
Cyclin G2	CCNG2	AW134535	74 // regulation of cell cycle	1,23	1,93	0,90	1,9127	1,42	1,44
zyxin	ZYX	NM_003461	7155 // cell adhesion	1,83	1,17	0,84	1,9311	1,46	1,40
vesicle amine transport protein 1 homolog (T californica)	VAT1	BC001913	16049 // cell growth	1,76	1,45	0,99	1,9338	1,47	1,25
Cbp/p300-interacting transactivator, with Glu/Asp-rich carboxy-terminal domain, 2	CITED2	NM_006079	6357 // regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	1,56	1,49	0,81	1,9840	1,70	0,83
Ras-related GTP binding C	RRAGC	AK023373	6350 // transcription	1,14	1,15	0,97	2,0289	1,43	1,40
SRY (sex determining region Y)-box 4	SOX4	NM_003107	6350 // transcription	1,39	1,99	0,86	2,0379	1,69	1,19
ring finger protein 44	RNF44	NM_014901	16567 // protein ubiquitination	1,60	1,98	0,96	2,0523	1,73	1,27
Jumonji, AT rich interactive domain 1B (RBP2-like)	JARID1B	NM_006618	6355 // regulation of transcription, DNA-dependent	1,45	1,52	0,95	2,1496	1,63	1,36
cysteine-rich, angiogenic inducer, 61	CYR61	NM_001554	1558 // regulation of cell growth	3,67	1,88	1,09	2,2111	1,82	1,11
transforming growth factor, beta 2	TGFB2	M19154	74 // regulation of cell cycle	1,81	1,58	1,10	2,2208	1,57	1,04
proline-rich nuclear receptor coactivator 1	PNRC1	AF279899	6350 // transcription	1,34	1,35	0,87	2,2269	1,76	1,41
growth differentiation factor 15	GDF15	BC000529	7165 // signal transduction	1,07	0,63	1,07	2,2343	1,93	0,90
insulin-like growth factor binding protein 2, 36kDa	IGFBP2	NM_000597	1558 // regulation of cell growth	2,76	2,23	0,82	2,3421	2,01	1,00
fibronectin leucine rich transmembrane protein 3	FLRT3	NM_013281	7155 // cell adhesion	2,02	2,15	0,81	2,3919	1,48	1,37
BTB and CNC homology 1, basic leucine zipper transcription factor 2	BACH2	AK027193	6350 // transcription	1,96	1,67	0,99	2,4555	1,76	1,20
cyclin-dependent kinase inhibitor 1C (p57, Kip2)	CDKN1C	R78668	79 // regulation of cyclin dependent protein kinase activity	1,30	1,19	1,09	2,4962	1,80	1,48
signal transducer and activator of transcription 4	STAT4	NM_003151	6350 // transcription	1,25	1,01	1,15	2,7361	1,99	1,02
leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 5	LGR5	AF062006	7165 // signal transduction	2,01	2,11	1,34	3,3813	2,86	1,12
<b>durch kombinierte Rezeptorinhibierung reguliert</b>									
mutS homolog 2, colon cancer, nonpolyposis type 1 (E. coli)	MSH2	U04045	6298 // mismatch repair	0,88	1,03	0,91	0,33	0,3910	0,87
alanyl-tRNA synthetase	AARS	NM_001605	6412 // protein biosynthesis	0,64	0,83	1,00	0,35	0,4028	0,72
synaptobrevin-like 1	SYBL1	NM_005638	6355 // regulation of transcription, DNA-dependent	0,95	0,82	0,92	0,32	0,4544	0,95
TAF12 RNA polymerase II, TATA box binding protein (TBP)-associated factor, 20kDa	TAF12	D50544	6350 // transcription	0,86	0,82	1,00	0,46	0,5147	0,79
mitochondrial ribosomal protein L9	MRPL9	BC004517	6412 // protein biosynthesis	0,92	0,98	0,87	0,50	0,5335	0,85
septin 10	SEPT10	BF966021	7049 // cell cycle	0,96	1,09	0,81	0,53	0,5420	0,83
pyruvate dehydrogenase complex, component X	PDHX	NM_003477	8152 // metabolism	0,86	0,62	0,91	0,42	0,5590	0,83
aprtaxin	APTX	NM_017692	12 // single strand break repair	0,70	0,81	0,92	0,54	0,5787	0,87
v-myb myeloblastosis viral oncogene homolog (avian)-like 2	MYBL2	NM_002466	74 // regulation of cell cycle	0,72	1,07	0,85	0,47	0,5926	0,88
enoyl Coenzyme A hydratase domain containing 3	ECHDC3	NM_024693	8152 // metabolism	0,58	0,79	0,91	0,58	0,6053	1,14
seryl-tRNA synthetase 2	SARS2	NM_017827	6412 // protein biosynthesis	0,86	0,87	0,94	0,64	0,6334	0,92
E-1 enzyme	MASA	NM_021204	8152 // metabolism	0,76	0,78	0,91	0,51	0,6348	0,82
immature colon carcinoma transcript 1	ICT1	NM_001545	6415 // translational termination	0,79	0,73	0,94	0,57	0,6375	0,69

Die Genexpression ist als x-fache Veränderung im Vergleich zu unbehandelten Zellen angegeben

## Fortsetzung Tabelle O: regulierte Gene funktioneller Prozesse

Gen	Gensymbol	'gene bank accession no.'	Genontology Biological Process	IGF-II ds1	IGF-II ds3	INSR ds1	IGF1R ds3	Rez. Mix	nonsense siRNA
polymerase (DNA directed), epsilon 3 (p17 subunit)	POLE3	BC004170	6260 // DNA replication	0,64	0,77	0,86	0,49	0,6434	0,76
ribonuclease H2, large subunit	RNASEH2A	NM_006397	6260 // DNA replication	0,84	1,07	0,90	0,57	0,6455	0,75
cyclin J	CCNJ	NM_019084	74 // regulation of cell cycle	0,93	1,48	0,86	0,67	0,6469	1,14
zinc finger, MYND domain containing 11	ZMYND11	BE250417	122 // negative regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	1,22	1,39	0,97	0,61	0,6471	1,32
DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 3 beta	DNMT3B	NM_006892	67 // DNA replication and chromosome cycle	0,84	0,93	0,96	0,56	0,6475	1,35
phospholysine phosphohistidine inorganic pyrophosphate phosphatase	LHPP	NM_022126	8152 // metabolism	0,85	0,79	0,83	0,61	0,6529	0,92
proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non- ATPase, 8	PSMD8	NM_002812	74 // regulation of cell cycle	0,87	0,80	0,91	0,69	0,6610	0,71
Insulin-like growth factor 1 receptor	IGF1R	AI830698	74 // regulation of cell cycle	1,04	1,09	0,86	0,66	0,6651	0,86
granulin	GRN	NM_002087	7165 // signal transduction	1,35	1,40	0,92	1,79	1,5007	1,29
SRB7 suppressor of RNA polymerase B homolog (yeast)	SURB7	AI688580	6350 // transcription	1,42	1,15	0,97	1,72	1,5010	1,04
zinc finger protein 84 (HPF2)	ZNF84	NM_003428	6350 // transcription	1,35	1,36	1,13	1,74	1,5013	0,97
maternal G10 transcript	G10	NM_003910	6357 // regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	0,96	0,96	0,93	1,75	1,5132	1,07
neural precursor cell expressed, developmentally down- regulated 9	NEDD9	AL136139	74 // regulation of cell cycle	1,60	1,42	1,03	1,86	1,5132	1,30
headcase homolog (Drosophila)	HECA	NM_016217	74 // regulation of cell cycle	1,51	1,55	0,96	1,81	1,5204	1,27
pre-B-cell leukemia transcription factor interacting protein 1	PBXIP1	NM_020524	16481 // negative regulation of transcription	1,44	1,37	0,96	1,89	1,5292	1,34
cadherin 6, type 2, K-cadherin (fetal kidney)	CDH6	NM_004932	7155 // cell adhesion	1,93	2,12	1,09	1,75	1,5368	1,46
jumonji domain containing 1C	JMJD1C	AI694023	6355 // regulation of transcription, DNA- dependent	1,15	1,23	0,88	1,80	1,5400	1,08
CDC-like kinase 1	CLK1	AI251890	74 // regulation of cell cycle	1,23	1,27	0,97	1,84	1,5431	1,13
F-box protein 46	FBXO46	NM_012066	6512 // ubiquitin cycle	1,15	1,15	1,03	1,78	1,5450	1,03
growth arrest and DNA-damage-inducible, beta	GADD45B	NM_015675	185 // activation of MAPKKK	1,68	1,19	1,04	1,79	1,5483	1,39
hematopoietically expressed homeobox	HHEX	NM_001529	6355 // regulation of transcription, DNA- dependent	1,28	1,27	0,97	1,51	1,5505	1,17
Rap guanine nucleotide exchange factor (GEF) 2	RAPGEF2	BF439282	165 // MAPKKK cascade	1,33	1,22	0,98	1,72	1,5515	1,28
S100 calcium binding protein A6 (calcyclin)	S100A6	NM_014624	74 // regulation of cell cycle	4,26	1,02	0,91	1,79	1,5603	1,08
membrane-associated ring finger (C3HC4) 3	MARCH3	AW593996	16567 // protein ubiquitination	1,18	0,97	1,08	1,87	1,5615	1,23
E74-like factor 3 (ets domain transcription factor, epithelial-specific )	ELF3	AF017307	6355 // regulation of transcription, DNA- dependent	1,45	1,13	0,88	1,79	1,5617	1,35
fibronectin leucine rich transmembrane protein 2	FLRT2	NM_013231	7155 // cell adhesion	1,41	1,85	1,00	1,65	1,5693	0,92
transforming growth factor, beta 2	TGFB2	M19154	74 // regulation of cell cycle	1,81	1,58	1,10	2,22	1,5701	1,04
alpha thalassemia/mental retardation syndrome X-linked (RAD54 homolog, S. cerevisiae)	ATRAX	AI650257	6281 // DNA repair	1,35	1,48	0,90	1,73	1,5796	1,10
cadherin 19, type 2	CDH19	NM_021153	7156 // homophilic cell adhesion	1,27	1,57	0,99	1,51	1,5893	1,17
activity-dependent neuroprotector	ADNP	NM_015339	6355 // regulation of transcription, DNA- dependent	1,19	1,46	0,94	1,76	1,6081	1,09
Jumonji, AT rich interactive domain 1B (RBP2-like)	JARID1B	NM_006618	6355 // regulation of transcription, DNA- dependent	1,45	1,52	0,95	2,15	1,6261	1,36

Die Genexpression ist als x-fache Veränderung im Vergleich zu unbehandelten Zellen angegeben

## Fortsetzung Tabelle O: regulierte Gene funktioneller Prozesse

Gen	Gensymbol	'gene bank accession no.'	Genontology Biological Process	IGF-II ds1	IGF-II ds3	INSR ds1	IGF1R ds3	Rez. Mix	nonsense siRNA
histone deacetylase 5	HDAC5	NM_005474	74 // regulation of cell cycle	0,98	1,04	1,06	1,85	1,6392	1,21
SRY (sex determining region Y)-box 4	SOX4	NM_003107	6350 // transcription	1,39	1,99	0,86	2,04	1,6873	1,19
protein kinase C binding protein 1	PRKCBP1	NM_018634	6355 // regulation of transcription, DNA-dependent	1,19	1,12	0,97	1,84	1,6888	0,81
son of sevenless homolog 1 (Drosophila)	SOS1	L13857	7265 // Ras protein signal transduction	1,31	1,26	1,07	1,68	1,6934	1,27
Cbp/p300-interacting transactivator, with Glu/Asp-rich carboxy-terminal domain, 2	CITED2	NM_006079	6357 // regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	1,56	1,49	0,81	1,98	1,7005	0,83
ring finger protein 44	RNF44	NM_014901	16567 // protein ubiquitination	1,60	1,98	0,96	2,05	1,7290	1,27
dickkopf homolog 1 (Xenopus laevis)	DKK1	NM_012242	7275 // development 30178 // negative regulation of Wnt receptor signaling	1,61	2,19	1,33	1,74	1,7308	1,17
insulin-like growth factor binding protein 1	IGFBP1	NM_000596	1558 // regulation of cell growth	0,87	0,98	0,99	1,23	1,7375	0,82
BTB and CNC homology 1, basic leucine zipper transcription factor 2	BACH2	AK027193	6350 // transcription	1,96	1,67	0,99	2,46	1,7603	1,20
proline-rich nuclear receptor coactivator 1	PNRC1	AF279899	6350 // transcription	1,34	1,35	0,87	2,23	1,7644	1,41
cyclin-dependent kinase inhibitor 1C (p57, Kip2)	CDKN1C	R78668	79 // regulation of cyclin dependent protein kinase activity /	1,30	1,19	1,09	2,50	1,7992	1,48
cysteine-rich, angiogenic inducer, 61	CYR61	NM_001554	1558 // regulation of cell growth	3,67	1,88	1,09	2,21	1,8228	1,11
Rho family GTPase 3	RND3	BG054844	7264 // small GTPase mediated signal transduction	1,88	1,57	1,04	1,88	1,8385	1,07
growth differentiation factor 15	GDF15	BC000529	7165 // signal transduction	1,07	0,63	1,07	2,23	1,9255	0,90
signal transducer and activator of transcription 4	STAT4	NM_003151	6350 // transcription	1,25	1,01	1,15	2,74	1,9937	1,02
insulin-like growth factor binding protein 2, 36kDa	IGFBP2	NM_000597	1558 // regulation of cell growth	2,76	2,23	0,82	2,34	2,0137	1,00
protocadherin 17	PCDH17	NM_014459	7155 // cell adhesion	1,57	2,29	0,98	1,85	2,0165	0,78
leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 5	LGR5	AF062006	7165 // signal transduction	2,01	2,11	1,34	3,38	2,8567	1,12
<b>durch IGF-II-Inhibierung reguliert</b>									
complement component 5	C5	NM_001735	187 // activation of MAPK	0,40836	0,44082	0,83	0,88	0,96	0,69
CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), beta	CEBPB	AL564683	6350 // transcription	0,55031	0,59938	0,83	0,96	0,83	0,68
nuclear receptor subfamily 0, group B, member 2	NR0B2	NM_021969	122 // negative regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	0,63289	0,63088	0,84	1,07	1,01	0,82
headcase homolog (Drosophila)	HECA	NM_016217	74 // regulation of cell cycle	1,51068	1,54926	0,96	1,81	1,52	1,27
protocadherin 17	PCDH17	NM_014459	7155 // cell adhesion	1,56550	2,28573	0,98	1,85	2,02	0,78
FAT tumor suppressor homolog 4 (Drosophila)	FAT4	NM_024582	7155 // cell adhesion	1,56998	1,55037	1,08	1,39	1,44	1,16
ring finger protein 44	RNF44	NM_014901	16567 // protein ubiquitination	1,60107	1,98257	0,96	2,05	1,73	1,27
dickkopf homolog 1 (Xenopus laevis)	DKK1	NM_012242	7275 // development 30178 // negative regulation of Wnt receptor signaling	1,60720	2,18519	1,33	1,74	1,73	1,17
transforming growth factor, beta 2	TGFB2	M19154	74 // regulation of cell cycle	1,81067	1,58341	1,10	2,22	1,57	1,04
coagulation factor II (thrombin) receptor	F2R	NM_001992	74 // regulation of cell cycle	1,85175	1,50138	0,92	1,23	1,12	1,17
Rho-related BTB domain containing 1	RHOBTB1	AB018283	7264 // small GTPase mediated signal transduction	1,85796	1,85433	0,94	1,65	1,26	0,98
Rho family GTPase 3	RND3	BG054844	7264 // small GTPase mediated signal transduction	1,87759	1,57139	1,04	1,88	1,84	1,07

Die Genexpression ist als x-fache Veränderung im Vergleich zu unbehandelten Zellen angegeben

## Fortsetzung Tabelle O: regulierte Gene funktioneller Prozesse

Gen	Gensymbol	'gene bank accession no.'	Genontology Biological Process	IGF-II ds1	IGF-II ds3	INSR ds1	IGF1R ds3	Rez. Mix	nonsense siRNA
cadherin 6, type 2, K-cadherin (fetal kidney)	CDH6	NM_004932	7155 // cell adhesion	1,93037	2,11923	1,09	1,75	1,54	1,46
BTB and CNC homology 1, basic leucine zipper transcription factor 2	BACH2	AK027193	6350 // transcription	1,95547	1,67466	0,99	2,46	1,76	1,20
RNA binding motif, single stranded interacting protein 1	RBMS1	NM_016839	6260 // DNA replication	1,98730	1,59458	0,84	1,65	1,47	1,42
leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 5	LGR5	AF062006	7165 // signal transduction	2,01299	2,10695	1,34	3,38	2,86	1,12
tumor necrosis factor, alpha-induced protein 8	TNFAIP8	NM_014350	6916 // anti-apoptosis	2,01606	1,98822	0,95	1,14	1,12	1,36
fibronectin leucine rich transmembrane protein 3	FLRT3	NM_013281	7155 // cell adhesion	2,01619	2,14577	0,81	2,39	1,48	1,37
Desmoglein 2	DSG2	NM_001943	7155 // cell adhesion	2,12049	1,65547	0,93	1,62	1,42	1,43
insulin-like growth factor binding protein 2, 36kDa	IGFBP2	NM_000597	1558 // regulation of cell growth	2,75549	2,22834	0,82	2,34	2,01	1,00
tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (erythroid potentiating activity, collagenase inhibitor)	TIMP1	NM_003254	7275 // development 8284 // positive regulation of cell proliferation	2,88967	1,66517	1,03	1,75	1,45	1,40
cysteine-rich, angiogenic inducer, 61	CYR61	NM_001554	1558 // regulation of cell growth	3,67323	1,88313	1,09	2,21	1,82	1,11
<b>spezifisch durch IGF1R-Inhibierung reguliert</b>									
antigen identified by monoclonal antibody Ki-67	MKI67	AU152107	74 // regulation of cell cycle	0,71	0,89	0,95	0,5178	0,68	0,79
cyclin-dependent kinase inhibitor 3 (CDK2-associated dual specificity phosphatase)	CDKN3	AF213033	79 // regulation of cyclin dependent protein kinase activity	0,96	0,85	0,93	0,5330	0,70	0,87
primase, polypeptide 1, 49kDa	PRIM1	NM_000946	6260 // DNA replication	0,82	1,11	1,01	0,5479	0,71	0,76
cyclin A2	CCNA2	NM_001237	79 // regulation of cyclin dependent protein kinase activity	0,81	0,73	0,89	0,5717	0,79	0,76
SLC2A4 regulator	SLC2A4RG	BE898559	6350 // transcription	0,64	0,68	0,74	0,5769	0,72	0,79
KIAA0664 protein	KIAA0664	AB014564	6412 // protein biosynthesis	0,67	0,65	1,00	0,5857	0,75	0,73
nuclear receptor subfamily 1, group H, member 3	NR1H3	NM_005693	6350 // transcription	0,68	0,61	0,93	0,5915	0,70	0,71
ligatin	LGTN	NM_006893	6412 // protein biosynthesis	0,71	0,78	1,02	0,6027	0,68	0,73
carbonic reductase 4	CBR4	AL049442	8152 // metabolism	0,95	1,15	1,01	0,6063	0,79	0,97
nidogen (enactin)	NID	BF940043	7160 // cell-matrix adhesion	0,87	1,11	0,74	0,6116	0,75	0,89
arylacetamide deacetylase (esterase)	AADAC	NM_001086	8152 // metabolism	0,67	0,71	1,08	0,6170	0,83	0,92
inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase A	ITPKA	NM_002220	7165 // signal transduction	0,74	0,65	1,00	0,6172	0,69	1,11
protein kinase, DNA-activated, catalytic polypeptide	PRKDC	U47077	6302 // double-strand break repair	0,73	0,94	0,94	0,6186	0,73	0,78
polymerase (DNA directed), epsilon 2 (p59 subunit)	POLE2	NM_002692	6260 // DNA replication	0,81	0,78	0,93	0,6195	0,73	0,83
origin recognition complex, subunit 3-like (yeast)	ORC3L	AF125507	6260 // DNA replication	0,92	0,83	0,93	0,6199	0,76	0,74
MCM6 minichromosome maintenance deficient 6 (MIS5 homolog, S. pombe) (S. cerevisiae)	MCM6	NM_005915	6260 // DNA replication	0,83	1,13	0,93	0,6222	0,78	0,86
1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase 5 (lysophosphatidic acid acyltransferase, epsilon)	AGPAT5	NM_018361	8152 // metabolism	0,95	0,94	0,98	0,6237	0,69	0,87
anaphase promoting complex subunit 5 /// anaphase promoting complex subunit 5	ANAPC5	T33068	74 // regulation of cell cycle	0,76	0,88	0,93	0,6241	0,70	0,83
interferon regulatory factor 3	IRF3	NM_001571	6350 // transcription	0,88	0,82	0,99	0,6258	0,69	0,79
mitochondrial ribosomal protein L17	MRPL17	AK026857	6412 // protein biosynthesis	0,83	0,81	1,03	0,6283	0,79	0,77
poly (ADP-ribose) polymerase family, member 1	PARP1	M32721	6281 // DNA repair	0,73	1,00	0,85	0,6296	0,71	0,76
hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 12	HSD17B12	NM_016142	8152 // metabolism	0,74	1,03	0,83	0,6304	0,68	0,81

Die Genexpression ist als x-fache Veränderung im Vergleich zu unbehandelten Zellen angegeben

## Fortsetzung Tabelle O: regulierte Gene funktioneller Prozesse

Gen	Gensymbol	'gene bank accession no.'	Genontology Biological Process	IGF-II ds1	IGF-II ds3	INSR ds1	IGF1R ds3	Rez. Mix	nonsense siRNA
retinol dehydrogenase 11 (all-trans and 9-cis)	RDH11	AL096716	8152 // metabolism	0,99	1,14	0,79	0,6340	0,74	0,94
FLJ23311 protein	FLJ23311	NM_024680	74 // regulation of cell cycle	0,83	1,03	0,88	0,6412	0,76	0,78
deoxyhypusine synthase	DHPS	NM_001930	6412 // protein biosynthesis	0,87	0,99	1,00	0,6420	0,74	0,96
cadherin 1, type 1, E-cadherin (epithelial)	CDH1	NM_004360	7155 // cell adhesion	1,10	0,70	0,96	0,6530	0,76	0,95
epithelial V-like antigen 1	EVA1	NM_005797	7155 // cell adhesion	0,74	0,55	0,87	0,6542	0,73	0,76
SFRS protein kinase 1	SRPK1	AW082913	74 // regulation of cell cycle	0,82	0,94	1,02	0,6552	0,70	0,73
sex comb on midleg-like 1 (Drosophila)	SCML1	BF001786	6350 // transcription	0,70	0,72	0,92	0,6601	0,73	0,82
inhibitor of DNA binding 4, dominant negative helix-loop-helix protein	ID4	AW157094	6357 // regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	0,61	0,90	0,86	0,6618	0,80	0,70
Insulin-like growth factor 1 receptor	IGF1R	AI830698	74 // regulation of cell cycle	1,04	1,09	0,86	0,6618	0,67	0,86
dehydrogenase/reductase (SDR family) member 1	DHRS1	AL050217	8152 // metabolism	1,00	0,71	0,93	0,6627	0,74	1,12
cadherin, EGF LAG seven-pass G-type receptor 3 (flamingo homolog, Drosophila)	CELSR3	NM_001407	7155 // cell adhesion	1,19	1,27	1,04	1,5008	1,37	1,18
TRAF2 and NCK interacting kinase	TNIK	AF172268	6445 // regulation of translation	1,42	1,27	1,00	1,5026	1,25	0,89
hypothetical protein FLJ14166	FLJ14166	NM_024565	74 // regulation of cell cycle	1,38	1,48	0,89	1,5086	1,18	1,03
protocadherin beta 8	PCDHB8	NM_019120	7155 // cell adhesion	1,12	1,18	1,01	1,5086	1,37	0,94
putative translation initiation factor	SUI1	AF083441	6412 // protein biosynthesis	1,01	1,08	1,05	1,5091	1,46	1,04
transcription factor 12 (HTF4, helix-loop-helix transcription factors 4)	TCF12	AL559478	6350 // transcription	1,14	1,20	0,88	1,5109	1,33	1,15
suppressor of hairy wing homolog 1 (Drosophila)	SUHW1	AA558468	6350 // transcription	1,26	1,16	1,16	1,5164	1,27	1,06
thyroid hormone receptor interactor 3	TRIP3	AI131008	6355 // regulation of transcription, DNA-dependent	1,03	1,09	0,89	1,5177	1,26	1,10
single-stranded DNA binding protein 2	SSBP2	NM_012446	45449 // regulation of transcription	1,42	1,68	1,00	1,5193	1,25	1,01
tubby like protein 4	TULP4	NM_020245	6355 // regulation of transcription, DNA-dependent	1,21	1,42	0,94	1,5201	1,28	1,15
ribosomal protein L22	RPL22	D17652	6412 // protein biosynthesis	0,77	0,93	0,95	1,5279	1,32	1,43
eukaryotic translation initiation factor 2C, 3	EIF2C3	NM_024852	6412 // protein biosynthesis	1,13	1,02	1,03	1,5280	1,41	0,97
RING1 and YY1 binding protein	RYBP	AB029551	122 // negative regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	1,36	1,44	0,92	1,5296	1,35	1,13
HMG-box transcription factor 1	HBP1	NM_012257	6355 // regulation of transcription, DNA-dependent	1,09	1,24	1,01	1,5297	1,33	1,20
zinc finger protein 277	ZNF277	AK027128	6350 // transcription	0,94	1,12	0,88	1,5304	1,32	1,16
programmed cell death 6 interacting protein	PDCD6IP	NM_013374	6915 // apoptosis	1,24	1,14	0,95	1,5334	1,48	1,15
makorin, ring finger protein, 1 /// makorin, ring finger protein, 1	MKRN1	NM_013446	16567 // protein ubiquitination	1,10	1,00	0,88	1,5430	1,40	1,31
ring finger and KH domain containing 2	RKHD2	NM_016626	16567 // protein ubiquitination	1,31	1,68	0,93	1,5572	1,21	1,25
histidyl-tRNA synthetase-like	HARSL	U18937	6412 // protein biosynthesis	1,07	1,07	1,00	1,5606	1,35	1,01
zinc finger protein 134 (clone pHZ-15)	ZNF134	NM_003435	6350 // transcription	1,26	1,13	0,99	1,5614	1,28	0,90
ring finger protein 111	RNF111	NM_017610	16567 // protein ubiquitination	1,24	1,16	0,97	1,5626	1,39	1,14
farnesyltransferase, CAAX box, alpha /// farnesyltransferase, CAAX box, alpha	FNTA	BG168896	7179 // transforming growth factor beta receptor signaling pathway	1,09	0,98	1,00	1,5673	1,44	1,10
MAX interactor 1 /// MAX interactor 1	MXI1	NM_005962	6350 // transcription	1,03	1,42	1,00	1,5736	1,35	1,11

Die Genexpression ist als x-fache Veränderung im Vergleich zu unbehandelten Zellen angegeben

## Fortsetzung Tabelle O: regulierte Gene funktioneller Prozesse

Gen	Gensymbol	'gene bank accession no.'	Genontology Biological Process	IGF-II ds1	IGF-II ds3	INSR ds1	IGF1R ds3	Rez. Mix	nonsense siRNA
G protein-coupled receptor, family C, group 5, member C	GPRC5C	NM_022036	7165 // signal transduction	1,16	1,16	0,92	1,5745	1,37	1,37
retinoic acid induced 17	RAI17	AF070622	6350 // transcription	1,20	1,43	0,89	1,5830	1,45	1,31
guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha inhibiting activity polypeptide 1	GNAI1	AL049933	7165 // signal transduction	1,32	1,64	0,92	1,5865	1,42	1,00
Disabled homolog 2, mitogen-responsive phosphoprotein (Drosophila)	DAB2	N21202	8283 // cell proliferation	1,57	1,25	0,97	1,5895	1,36	1,05
zinc finger protein 435	ZNF435	NM_025231	6350 // transcription	1,23	1,47	0,98	1,6015	1,34	1,00
cyclin B1 interacting protein 1	CCNB1IP1	NM_021178	16567 // protein ubiquitination	1,08	0,84	0,94	1,6096	1,21	1,16
cofactor required for Sp1 transcriptional activation, subunit 6, 77kDa	CRSP6	AF105421	6350 // transcription	1,21	1,30	1,01	1,6489	1,44	1,16
bromodomain adjacent to zinc finger domain, 2B	BAZ2B	NM_013450	6350 // transcription	1,36	1,47	1,06	1,6514	1,42	1,23
zinc finger protein 140 (clone pHZ-39)	ZNF140	NM_003440	6350 // transcription	1,22	1,26	0,97	1,6640	1,30	0,99
trophoblast glycoprotein	TPBG	NM_006670	6928 // cell motility	1,65	1,41	0,93	1,6818	1,34	1,48
glycoprotein (transmembrane) nmb	GPNMB	NM_002510	8285 // negative regulation of cell proliferation	0,96	0,87	0,97	1,6969	1,28	0,81
tumor protein p53 binding protein, 2	TP53BP2	NM_005426	74 // regulation of cell cycle	1,30	1,47	0,99	1,6970	1,36	1,45
zinc finger protein 274	ZNF274	NM_016325	6350 // transcription	1,38	1,24	0,96	1,7017	1,38	1,01
G protein-coupled receptor 37 (endothelin receptor type B-like)	GPR37	U87460	7165 // signal transduction	1,39	1,33	1,06	1,7409	1,49	1,09
protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 15A	PPP1R15A	NM_014330	6915 // apoptosis 7050 // cell cycle arrest	1,31	1,42	0,96	1,7994	1,37	1,17
Ras-like without CAAX 1	RIT1	AF084462	7165 // signal transduction	1,45	1,17	1,02	1,8379	1,45	1,00
zinc finger protein 85 (HPF4, HTF1)	ZNF85	NM_003429	6350 // transcription	1,49	1,67	0,88	1,8455	1,45	0,97
Cyclin G2	CCNG2	AW134535	74 // regulation of cell cycle	1,23	1,93	0,90	1,9127	1,42	1,44
zyxin	ZYX	NM_003461	7155 // cell adhesion	1,83	1,17	0,84	1,9311	1,46	1,40
vesicle amine transport protein 1 homolog (T californica)	VAT1	BC001913	16049 // cell growth	1,76	1,45	0,99	1,9338	1,47	1,25
Ras-related GTP binding C	RRAGC	AK023373	6350 // transcription	1,14	1,15	0,97	2,0289	1,43	1,40
<b>spezifisch durch kombinierte Rezeptorinhibierung reguliert</b>									
cyclin J	CCNJ	NM_019084	74 // regulation of cell cycle	0,93	1,48	0,86	0,67	0,6469	1,14
proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 8	PSMD8	NM_002812	74 // regulation of cell cycle	0,87	0,80	0,91	0,69	0,6610	0,71
insulin-like growth factor binding protein 1	IGFBP1	NM_000596	1558 // regulation of cell growth	0,87	0,98	0,99	1,23	1,7375	0,82
<b>spezifisch durch IGF-II-Inhibierung reguliert</b>									
complement component 5	C5	NM_001735	187 // activation of MAPK	0,40836	0,44082	0,83	0,88	0,96	0,69
CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), beta	CEBPB	AL564683	6350 // transcription	0,55031	0,59938	0,83	0,96	0,83	0,68
nuclear receptor subfamily 0, group B, member 2	NR0B2	NM_021969	122 // negative regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	0,63289	0,63088	0,84	1,07	1,01	0,82
bone morphogenetic protein 4	BMP4	D30751	1501 // skeletal development	1,67055	1,54664	0,94	1,18	1,16	1,14
coagulation factor II (thrombin) receptor	F2R	NM_001992	74 // regulation of cell cycle	1,85175	1,50138	0,92	1,23	1,12	1,17
tumor necrosis factor, alpha-induced protein 8	TNFAIP8	NM_014350	6916 // anti-apoptosis	2,01606	1,98822	0,95	1,14	1,12	1,36

Die Genexpression ist als x-fache Veränderung im Vergleich zu unbehandelten Zellen angegeben

## Fortsetzung Tabelle O: regulierte Gene funktioneller Prozesse

Gen	Gensymbol	'gene bank accession no.'	Genontology Biological Process	IGF-II ds1	IGF-II ds3	INSR ds1	IGF1R ds3	Rez. Mix	nonsense siRNA
<b>durch IGF1R- und IGF-II-Inhibierung reguliert</b>									
kinesin family member 3C	KIF3C	AF035621	7018 // microtubule-based movement	1,73479	1,71825	1,06	1,61	1,34	1,15
Desmoglein 2	DSG2	NM_001943	7155 // cell adhesion	2,12049	1,65547	0,93	1,62	1,42	1,43
Rho-related BTB domain containing 1	RHOBTB1	AB018283	7264 // small GTPase mediated signal transduction	1,85796	1,85433	0,94	1,65	1,26	0,98
RNA binding motif, single stranded interacting protein 1	RBMS1	NM_016839	6260 // DNA replication	1,98730	1,59458	0,84	1,65	1,47	1,42
dickkopf homolog 1 (Xenopus laevis)	DKK1	NM_012242	7275 // development	1,60720	2,18519	1,33	1,74	1,73	1,17
cadherin 6, type 2, K-cadherin (fetal kidney)	CDH6	NM_004932	7155 // cell adhesion	1,93037	2,11923	1,09	1,75	1,54	1,46
tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (erythroid potentiating activity, collagenase inhibitor)	TIMP1	NM_003254	7275 // development 8284 // positive regulation of cell proliferation	2,88967	1,66517	1,03	1,75	1,45	1,40
headcase homolog (Drosophila)	HECA	NM_016217	74 // regulation of cell cycle	1,51068	1,54926	0,96	1,81	1,52	1,27
protocadherin 17	PCDH17	NM_014459	7155 // cell adhesion	1,56550	2,28573	0,98	1,85	2,02	0,78
Rho family GTPase 3	RND3	BG054844	7264 // small GTPase mediated signal transduction	1,87759	1,57139	1,04	1,88	1,84	1,07
ring finger protein 44	RNF44	NM_014901	16567 // protein ubiquitination	1,60107	1,98257	0,96	2,05	1,73	1,27
cysteine-rich, angiogenic inducer, 61	CYR61	NM_001554	1558 // regulation of cell growth	3,67323	1,88313	1,09	2,21	1,82	1,11
transforming growth factor, beta 2	TGFB2	M19154	74 // regulation of cell cycle	1,81067	1,58341	1,10	2,22	1,57	1,04
prostaglandin E receptor 4 (subtype EP4)	PTGER4	AI675173	6955 // immune response	1,51805	4,38052	0,99	2,33	2,26	1,24
insulin-like growth factor binding protein 2, 36kDa	IGFBP2	NM_000597	1558 // regulation of cell growth	2,75549	2,22834	0,82	2,34	2,01	1,00
fibronectin leucine rich transmembrane protein 3	FLRT3	NM_013281	7155 // cell adhesion	2,01619	2,14577	0,81	2,39	1,48	1,37
BTB and CNC homology 1, basic leucine zipper transcription factor 2	BACH2	AK027193	6350 // transcription	1,95547	1,67466	0,99	2,46	1,76	1,20
leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 5	LGR5	AF062006	7165 // signal transduction	2,01299	2,10695	1,34	3,38	2,86	1,12
<b>durch kombinierte Rezeptor-- und IGF-II-Inhibierung reguliert</b>									
headcase homolog (Drosophila)	HECA	NM_016217	74 // regulation of cell cycle	1,510675	1,55	0,96	1,81	1,5204	1,27
cadherin 6, type 2, K-cadherin (fetal kidney)	CDH6	NM_004932	7155 // cell adhesion	1,930372	2,12	1,09	1,75	1,5368	1,46
transforming growth factor, beta 2	TGFB2	M19154	74 // regulation of cell cycle	1,810666	1,58	1,10	2,22	1,5701	1,04
ring finger protein 44	RNF44	NM_014901	16567 // protein ubiquitination	1,601072	1,98	0,96	2,05	1,7290	1,27
dickkopf homolog 1 (Xenopus laevis)	DKK1	NM_012242	7275 // development/ 30178 // negative regulation of Wnt receptor signaling	1,607203	2,19	1,33	1,74	1,7308	1,17
BTB and CNC homology 1, basic leucine zipper transcription factor 2	BACH2	AK027193	6350 // transcription	1,955472	1,67	0,99	2,46	1,7603	1,20
cysteine-rich, angiogenic inducer, 61	CYR61	NM_001554	1558 // regulation of cell growth	3,673227	1,88	1,09	2,21	1,8228	1,11
Rho family GTPase 3	RND3	BG054844	7264 // small GTPase mediated signal transduction	1,877591	1,57	1,04	1,88	1,8385	1,07
insulin-like growth factor binding protein 2, 36kDa	IGFBP2	NM_000597	1558 // regulation of cell growth	2,755486	2,23	0,82	2,34	2,0137	1,00
protocadherin 17	PCDH17	NM_014459	7155 // cell adhesion	1,565495	2,29	0,98	1,85	2,0165	0,78
chondroitin sulfate proteoglycan 2 (versican)	CSPG2	BF590263	7275 // development	4,242331	4,27	0,95	3,86	2,6163	1,48

Die Genexpression ist als x-fache Veränderung im Vergleich zu unbehandelten Zellen angegeben

## Fortsetzung Tabelle O: regulierte Gene funktioneller Prozesse

Gen	Gensymbol	'gene bank accession no.'	Genontology Biological Process	IGF-II ds1	IGF-II ds3	INSR ds1	IGF1R ds3	Rez. Mix	nonsense siRNA
<b>durch IGF1R- und kombinierte Rezeptorinhibierung reguliert</b>									
mutS homolog 2, colon cancer, nonpolyposis type 1 (E. coli)	MSH2	U04045	6298 // mismatch repair	0,88	1,03	0,91	0,33	0,3910	0,87
alanyl-tRNA synthetase	AARS	NM_001605	6412 // protein biosynthesis	0,64	0,83	1,00	0,35	0,4028	0,72
synaptobrevin-like 1	SYBL1	NM_005638	6355 // regulation of transcription, DNA-dependent	0,95	0,82	0,92	0,32	0,4544	0,95
TAF12 RNA polymerase II, TATA box binding protein (TBP)-associated factor, 20kDa	TAF12	D50544	6350 // transcription	0,86	0,82	1,00	0,46	0,5147	0,79
mitochondrial ribosomal protein L9	MRPL9	BC004517	6412 // protein biosynthesis	0,92	0,98	0,87	0,50	0,5335	0,85
septin 10	SEPT10	BF966021	7049 // cell cycle	0,96	1,09	0,81	0,53	0,5420	0,83
pyruvate dehydrogenase complex, component X	PDHX	NM_003477	8152 // metabolism	0,86	0,62	0,91	0,42	0,5590	0,83
aprataxin	APTX	NM_017692	12 // single strand break	0,70	0,81	0,92	0,54	0,5787	0,87
v-myb myeloblastosis viral oncogene homolog (avian)-like 2	MYBL2	NM_002466	74 // regulation of cell cycle	0,72	1,07	0,85	0,47	0,5926	0,88
enoyl Coenzyme A hydratase domain containing 3	ECHDC3	NM_024693	8152 // metabolism	0,58	0,79	0,91	0,58	0,6053	1,14
seryl-tRNA synthetase 2	SARS2	NM_017827	6412 // protein biosynthesis	0,86	0,87	0,94	0,64	0,6334	0,92
E-1 enzyme	MASA	NM_021204	8152 // metabolism	0,76	0,78	0,91	0,51	0,6348	0,82
polymerase (DNA directed), epsilon 3 (p17 subunit)	POLE3	BC004170	6260 // DNA replication	0,64	0,77	0,86	0,49	0,6434	0,76
ribonuclease H2, large subunit	RNASEH2A	NM_006397	6260 // DNA replication	0,84	1,07	0,90	0,57	0,6455	0,75
zinc finger, MYND domain containing 11	ZMYND11	BE250417	122 // negative regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	1,22	1,39	0,97	0,61	0,6471	1,32
DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 3 beta	DNMT3B	NM_006892	67 // DNA replication and chromosome cycle	0,84	0,93	0,96	0,56	0,6475	1,35
phospholysine phosphohistidine inorganic pyrophosphate phosphatase	LHPP	NM_022126	8152 // metabolism	0,85	0,79	0,83	0,61	0,6529	0,92
SRB7 suppressor of RNA polymerase B homolog (yeast)	SURB7	AI688580	6350 // transcription	1,42	1,15	0,97	1,72	1,5010	1,04
zinc finger protein 84 (HPF2)	ZNF84	NM_003428	6350 // transcription	1,35	1,36	1,13	1,74	1,5013	0,97
maternal G10 transcript	G10	NM_003910	6357 // regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	0,96	0,96	0,93	1,75	1,5132	1,07
neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 9	NEDD9	AL136139	74 // regulation of cell cycle	1,60	1,42	1,03	1,86	1,5132	1,30
headcase homolog (Drosophila)	HECA	NM_016217	74 // regulation of cell cycle	1,51	1,55	0,96	1,81	1,5204	1,27
pre-B-cell leukemia transcription factor interacting protein 1	PBXIP1	NM_020524	16481 // negative regulation of transcription	1,44	1,37	0,96	1,89	1,5292	1,34
cadherin 6, type 2, K-cadherin (fetal kidney)	CDH6	NM_004932	7155 // cell adhesion	1,93	2,12	1,09	1,75	1,5368	1,46
jumonji domain containing 1C	JMJD1C	AI694023	6355 // regulation of transcription, DNA-dependent	1,15	1,23	0,88	1,80	1,5400	1,08
CDC-like kinase 1	CLK1	AI251890	74 // regulation of cell cycle	1,23	1,27	0,97	1,84	1,5431	1,13
F-box protein 46	FBXO46	NM_012066	16567 // protein ubiquitination	1,15	1,15	1,03	1,78	1,5450	1,03
growth arrest and DNA-damage-inducible, beta	GADD45B	NM_015675	185 // activation of MAPKKK	1,68	1,19	1,04	1,79	1,5483	1,39
hematopoietically expressed homeobox	HHEX	NM_001529	6355 // regulation of transcription, DNA-dependent	1,28	1,27	0,97	1,51	1,5505	1,17

Die Genexpression ist als x-fache Veränderung im Vergleich zu unbehandelten Zellen angegeben



## Fortsetzung Tabelle O: regulierte Gene funktioneller Prozesse

Gen	Gensymbol	'gene bank accession no.'	Genontology Biological Process	IGF-II ds1	IGF-II ds3	INSR ds1	IGF1R ds3	Rez. Mix	nonsense siRNA
Rap guanine nucleotide exchange factor (GEF) 2	RAPGEF2	BF439282	165 // MAPKKK cascade	1,33	1,22	0,98	1,72	1,5515	1,28
S100 calcium binding protein A6 (calcyclin)	S100A6	NM_014624	74 // regulation of cell cycle	4,26	1,02	0,91	1,79	1,5603	1,08
membrane-associated ring finger (C3HC4) 3	MARCH3	AW593996	16567 // protein ubiquitination	1,18	0,97	1,08	1,87	1,5615	1,23
E74-like factor 3 (ets domain transcription factor, epithelial-specific)	ELF3	AF017307	6355 // regulation of transcription, DNA-dependent	1,45	1,13	0,88	1,79	1,5617	1,35
fibronectin leucine rich transmembrane protein 2	FLRT2	NM_013231	7155 // cell adhesion	1,41	1,85	1,00	1,65	1,5693	0,92
transforming growth factor, beta 2	TGFB2	M19154	74 // regulation of cell cycle	1,81	1,58	1,10	2,22	1,5701	1,04
alpha thalassemia/mental retardation syndrome X-linked (RAD54 homolog, S. cerevisiae)	ATRAX	AI650257	6260 // DNA replication	1,35	1,48	0,90	1,73	1,5796	1,10
cadherin 19, type 2	CDH19	NM_021153	7156 // homophilic cell adhesion	1,27	1,57	0,99	1,51	1,5893	1,17
activity-dependent neuroprotector	ADNP	NM_015339	6355 // regulation of transcription, DNA-dependent	1,19	1,46	0,94	1,76	1,6081	1,09
Jumonji, AT rich interactive domain 1B (RBP2-like)	JARID1B	NM_006618	6355 // regulation of transcription, DNA-dependent	1,45	1,52	0,95	2,15	1,6261	1,36
histone deacetylase 5	HDAC5	NM_005474	74 // regulation of cell cycle	0,98	1,04	1,06	1,85	1,6392	1,21
SRY (sex determining region Y)-box 4	SOX4	NM_003107	6350 // transcription	1,39	1,99	0,86	2,04	1,6873	1,19
protein kinase C binding protein 1	PRKCBP1	NM_018634	6355 // regulation of transcription, DNA-dependent	1,19	1,12	0,97	1,84	1,6888	0,81
son of sevenless homolog 1 (Drosophila)	SOS1	L13857	7265 // Ras protein signal transduction	1,31	1,26	1,07	1,68	1,6934	1,27
Cbp/p300-interacting transactivator, with Glu/Asp-rich carboxy-terminal domain, 2	CITED2	NM_006079	6357 // regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	1,56	1,49	0,81	1,98	1,7005	0,83
ring finger protein 44	RNF44	NM_014901	16567 // protein ubiquitination	1,60	1,98	0,96	2,05	1,7290	1,27
dickkopf homolog 1 (Xenopus laevis)	DKK1	NM_012242	7275 // development / 30178 // negative regulation of Wnt receptor signaling	1,61	2,19	1,33	1,74	1,7308	1,17
BTB and CNC homology 1, basic leucine zipper transcription factor 2	BACH2	AK027193	6350 // transcription	1,96	1,67	0,99	2,46	1,7603	1,20
proline-rich nuclear receptor coactivator 1	PNRC1	AF279899	6350 // transcription	1,34	1,35	0,87	2,23	1,7644	1,41
cyclin-dependent kinase inhibitor 1C (p57, Kip2)	CDKN1C	R78668	79 // regulation of cyclin dependent protein kinase activity	1,30	1,19	1,09	2,50	1,7992	1,48
cysteine-rich, angiogenic inducer, 61	CYR61	NM_001554	1558 // regulation of cell growth	3,67	1,88	1,09	2,21	1,8228	1,11
Rho family GTPase 3	RND3	BG054844	7264 // small GTPase mediated signal transduction	1,88	1,57	1,04	1,88	1,8385	1,07
signal transducer and activator of transcription 4	STAT4	NM_003151	6350 // transcription	1,25	1,01	1,15	2,74	1,9937	1,02
insulin-like growth factor binding protein 2, 36kDa	IGFBP2	NM_000597	1558 // regulation of cell growth	2,76	2,23	0,82	2,34	2,0137	1,00
protocadherin 17	PCDH17	NM_014459	7155 // cell adhesion	1,57	2,29	0,98	1,85	2,0165	0,78

Die Genexpression ist als x-fache Veränderung im Vergleich zu unbehandelten Zellen angegeben

## **7.2. Kurzzusammenfassung**

IGF-II ist in einigen humanen HCCs, eines der häufigsten humanen Malignome mit sehr schlechten Therapieoptionen, stark überexprimiert. Aufgrund der protumorigenen Wirkung stellt die IGF-Signalachse eine mögliche therapeutische Zielstruktur dar.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden in Huh-7- und Hep3B-Zellen die Funktion und Relevanz von IGF-II und den signaltransduzierenden Rezeptoren, INSR und IGF1R, mittels RNAi untersucht. Funktionelle Tests und ‚Gene Chip® Expression Arrays‘ ermöglichten, die Auswirkungen der verschiedenen Inhibierungen zu analysieren.

Sowohl nach der IGF-II- wie auch der IGF1R- und der kombinierte Rezeptorinhibierung konnten eine reduzierte Proliferation und Zellvitalität sowie eine Apoptoseinduktion nachgewiesen werden. Die deutlichsten Effekte in der Modifikation der Downstream-Signalmoleküle wurde durch die IGF-II-Reduktion erzielt, außerdem ergaben sich deutliche Hinweise, dass neben dem auch der INSR IGF-II-Signale vermittelt. Die Analyse der Signalmoleküle und die Array-Auswertungen belegen, dass die IGF-Achse in die Zelladhäsion involviert ist und die Inhibierung zu einer Zunahme der Zelladhäsion führt. Zudem konnte der Faktor C5 identifiziert werden, der protumorigen wirken kann und der ausschließlich nach IGF-II-Inhibierung in seiner Expression reduziert war. C5 könnte der diskriminierende Faktor zwischen Liganden- und Rezeptorinhibierung sein, der für die deutlicheren Effekte bei der Modifikation der Signalmoleküle verantwortlich ist.

Die Daten zeigen, dass eine alleinige Inhibierung des IGF1R zur Unterdrückung der IGF-II-vermittelten protumorigenen Effekte nicht ausreichend ist, da IGF-II alternativ an den INSR binden kann. Zudem gibt es Hinweise auf weitere protumorigene, IGF-II-regulierte Faktoren wie C5.

Die IGF-II-Inhibierung stellt eine potentielle, therapeutische Option dar, da sie zum Teil deutlichere Effekte als die Rezeptorreduktion zeigt und aufgrund der hohen Spezifität keine essentiellen Signalwege beeinträchtigt werden.

### 7.3. Abstract

Insulin-like growth factor (IGF)-II is known to be overexpressed in numerous tumor entities and involved in proliferation and anti-apoptosis of hepatocellular carcinoma (HCCs). Therefore the IGF signalling axis represents a molecular target for therapeutic options. To elucidate the possible role of this growth factor axis in hepatocarcinogenesis the IGF-II, INSR and IGF1R-expression is reduced by *RNAinterference*.

The transient inhibition of IGF-II and IGF1R as well as the combined receptor inhibition is associated with reduced cell vitality which is due to increased apoptosis and decreased proliferation. Furthermore a reduced activation of cytoplasmic signalling components was observed. Separate inhibition of IGF1R or INSR did not lead to a distinct modification of downstream effector activity, while combined reduction of receptor expression was associated with decreased phosphorylation as significant as caused by IGF-II-inhibition. This observation indicates an alternative IGF-II-signaltransduction via INSR. The analysis of the expression profiles confirmed the involvement of IGF signaltransduction in DNA-replication, DNA-repair, metabolism, apoptosis, cell-growth, cell-adhesion and protein-biosynthesis. Since DNA-repair, metabolism and protein-biosynthesis is not affected by IGF-II-inhibition, IGF1R and INSR provable mediate IGF-II-independent signals. The combinatorial treatment of HCC-cells with IGF-II-specific siRNA and anti-neoplastic agents (selective Cyclooxygenase-2 inhibitor Celecoxib) revealed super-additive effects concerning tumor cell viability.

In conclusion, IGF-II-expression can be specifically reduced by RNAi without effecting cognate metabolic pathways (glucose metabolism via insulin) or still essential IGF axis components (IGF-I). Reduced IGF-II-bioavailability leads to reduced tumor cell vitality due to diminished proliferation and elevated apoptosis. However, these results indicate, that both receptors are responsible for IGF-II-mediated signalling. Furthermore, tumor cells transfected with IGF-II-specific siRNA become sensitized against additional pro-apoptotic stimuli. Because of the functional receptor redundancy, highly specific inhibition of IGF-II-bioactivity by *RNAinterference* is a promising approach in the treatment of HCC as compared to receptor specific approaches.

**7.4. Erklärung gemäß der Promotionsordnung (§ 4 Abs. 1 Nr. 9)**

Ich versichere, daß ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit - einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen -, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; daß diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; daß sie - abgesehen von den unten angegebenen Teilpublikationen – noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, daß ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluß des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. Klein und Prof. Dr. Schirmacher betreut worden.

Tanja Nußbaum

**Teilpublikation:**

**Nussbaum, T., S. Vreden, M. Farsad, P. Schirmacher, K. Breuhahn** (2005). "Insulin-like growth factor (IGF)-II in human hepatocarcinogenesis - a potential therapeutic target." *Verh Dtsch Ges Pathol.* **79**: 55-60.

### **7.5. Danksagung**

Sehr geehrter Herr Professor Schirmacher, Ihnen danke ich für die Möglichkeit, meine Arbeit in ihrer Gruppe durchführen zu können. Es war schön, dass Sie sich stets Zeit genommen haben und meine Arbeit durch hilfreiche und kritische Anregungen begleitet haben.

Dem Zentrum für Molekulare Medizin in Köln danke ich für die Gewährung des Stipendiums, durch das ich drei Jahren finanziert wurde und welches mir die Teilnahme an zahlreichen Kongressen ermöglicht hat.

Herrn Professor Klein und Herrn Professor Abken danke ich für die Übernahme der Gutachten und die Hilfe, die Sie mir beim Unterfangen „Promovieren als Externe in Köln“ waren. Ebenso möchte ich Herrn Professor Dohmen danken, dass Sie sich kurzfristig als Prüfungsvorsitzender zu Verfügung gestellt haben.

Kai, Dir danke ich für die fachliche Betreuung, dafür, dass Du immer Zeit für mich hattest und vor allem dafür, dass Du beim Endspurt Überblick und Nerven behalten hast!

Meiner kleinen Horde fleißiger Korrekturleser, wobei Antje die war, die ALLES fand, möchte ich für die schöne Zusammenarbeit und die Unterstützung danken. Auch Dir Patrick sei für Deine Hilfe und die zahlreichen WB-Gele gedankt! Und allen anderen echten, adoptierten und auch ehemaligen Mitgliedern der „Wir sind Helden“-Truppe (oder war es das Gestüt?) möchte ich dafür danken, dass ich mich durch euch in Heidelberg so wohl fühle! Ohne euch wäre der Laboralltag so manches Mal ganz schön grau gewesen!

Dir liebe Eva gebührt dabei ganz besonderer Dank! Du hast mich in den letzten Wochen nicht nur im Labor ertragen, sondern auch zu Hause verwöhnt und motiviert. Außerdem wäre ich ohne Dich beim Schreiben vermutlich verhungert!

Meinen Eltern möchte ich für ihr Vertrauen, ihre Unterstützung und auch ihr Interesse danken. Es ist schön, dass ihr immer an mich geglaubt habt und euch für das, was ich mache so sehr interessiert! Und auch für die ein oder andere „Tankfüllung“ bin ich Dir, Papa, dankbar, denn die hat so manches Mal den Heimweg leichter gemacht!

Dir, mein geliebter Jojo, danke ich für Deine Unterstützung und dafür, dass es Dich in meinem Leben gibt! Du gibst mir die Energie, die Ruhe und die Motivation, die ich brauche, um solche Aufgaben zu meistern!

Und dann möchte ich noch all denen danken, die es verdient haben und die ich bis jetzt noch nicht erwähnt habe. Mein kleines Brüderchen, Du hast immer einen tröstenden Spruch gehabt, wenn ich mich mal wieder über die Eintönigkeit des Schreibens beschwert habe. Und auch Dir Michèle einen herzlichen Dank, denn hättest Du nicht vorgelegt, wer weiß wann ich dann angefangen hätte. Und alle, die zu erwähnen ich vergaß, bitte ich: seid mir nicht böse, ich weiß es zu schätzen!

## **7.6. Lebenslauf**

### **Persönliche Daten**

Name	Tanja Nußbaum
Wohnort	Ehrenberger Straße 94 42389 Wuppertal (0202)2602077
Geburtsdatum	21.12.1977
Geburtsort	Mettmann
Familienstand	ledig, keine Kinder

### **Schulbildung**

13.08.1984 – 06.07.1988	Grundschule in Gruiten
22.08.1988 – 21.06.1997	Städt. Gymnasium Haan,
27.06.1996 – 13.07.1996	Besuch der Deutschen Schülerakademie (Stipendium), Teilnahme am Kurs „Energiehaushalt Zelle“

### **Studium**

13.10.1997 – 03.08.2002	Biologiestudium an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf; mit Diplom abgeschlossen
seit dem 15.10.2003	Promotion an der Universität zu Köln, bis zum 31.12.2005 finanziert über ein Stipendium des Zentrums für Molekulare Medizin Köln
seit dem 01.08.2004	Durchführung der praktischen Arbeit meiner Promotion im Pathologischen Institut der Uni Heidelberg

### **weitere Beschäftigungen**

16.02.1998 – 27.03.1998	Werkstudentin bei der Bayer AG, Abteilung Biotechnologie in
17.08.1998 – 09.10.1998	Wuppertal
26.07.1999 – 17.09.1999	
17.07.2000 – 22.09.2000	
30.07.2001 – 21.09.2001	